

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Randomisierte Querschnittsuntersuchung  
über die Prävalenz des  
porzinen Circovirus Typ 2 und zugehöriger Genotypen  
in deutschen Schweinemastbeständen  
mittels Oral Fluids

von Marina Isabella Beisl  
aus Eggenfelden

München 2020



Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Krankheiten des Schweines

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Mitbetreuung durch: Priv.-Doz. Dr. Matthias Eddicks



**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

**Korreferent:** Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Tag der Promotion: 25. Juli 2020



*Meiner Familie*





## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Porzines Circovirus Typ 2.....</b>	<b>3</b>
1.1.	Morphologie und spezifische Eigenschaften .....	3
1.2.	Taxonomie und Nomenklatur .....	3
1.3.	Genotypen.....	4
1.3.1	Vorkommen und Verbreitung .....	4
1.3.2.	Veränderungen der Nachweishäufigkeit .....	6
1.4.	Epidemiologie .....	9
1.4.1.	Übertragung .....	9
1.4.2.	Einflussfaktoren auf die Verbreitung von PCV2 .....	11
1.4.3.	Nachweisraten von PCV2.....	12
1.5.	Vakzination .....	15
1.6.	Krankheitsbilder assoziiert mit PCV2 .....	18
<b>2.</b>	<b>Diagnostik.....</b>	<b>19</b>
2.1.	PCR .....	20
2.2.	Genotyp-spezifische PCR.....	22
2.3.	Sequenzierung .....	22
<b>3.</b>	<b>Oral Fluids.....</b>	<b>24</b>
3.1.	Möglichkeiten der Nutzung von Oral Fluids.....	24
3.2.	Ablauf der Probengewinnung von Oral Fluids.....	25
3.3.	Chancen aus der Nutzung von Oral Fluids .....	26
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>27</b>
<b>1.</b>	<b>Ziel dieser Arbeit.....</b>	<b>27</b>
<b>2.</b>	<b>Auswahl der Betriebe.....</b>	<b>28</b>
2.1.	Statistisches Gutachten des Stichprobenumfangs .....	28
2.2.	Two stage cluster sampling .....	29
2.3.	Kontaktaufnahme.....	31
2.4.	Auswahl der Betriebe.....	31
<b>3.</b>	<b>Beprobung .....</b>	<b>33</b>

<b>4.</b>	<b>Labordiagnostik .....</b>	<b>34</b>
4.1.	Aufreinigung der DNA .....	35
4.2.	Pan-PCV2-qPCR .....	35
4.3.	PCV2-Genotyp-spezifische qPCR .....	36
4.4.	Amplifikation und Sequenzierung .....	37
4.5.	Probenauswahl für die jeweiligen PCR-Untersuchungen .....	39
<b>5.</b>	<b>Fragebogen .....</b>	<b>41</b>
<b>6.</b>	<b>Definition unabhängiger und abhängiger Variablen .....</b>	<b>42</b>
6.1.	Nominale Variablen.....	42
6.1.1.	Unabhängige Variablen.....	42
6.1.2.	Abhängige Variablen.....	43
6.2.	Ordinale Variablen .....	43
6.2.1.	Unabhängige Variablen.....	43
6.2.2.	Abhängige Variablen.....	44
6.3.	Metrische Variablen .....	44
<b>7.</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>45</b>
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>46</b>
<b>1.</b>	<b>Deskriptive Beschreibung der Studienbestände .....</b>	<b>46</b>
1.1.	Betriebsform.....	46
1.2.	Impfschemata .....	46
1.3.	Bestandsmanagement .....	48
1.4.	Ferkelherkünfte .....	49
1.5.	Ferkelverluste über die Dauer der Mast.....	50
1.6.	Kennzahl der Therapiehäufigkeit .....	51
1.7.	Tiergesundheitsindices .....	52
1.8.	Anzahl der auswertbaren Oral Fluid Proben .....	54
<b>2.</b>	<b>Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung der Oral Fluids auf PCV2-DNA.....</b>	<b>55</b>
2.1.	Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung der Oral Fluid Poolproben auf PCV2-DNA .....	55
2.2.	Ergebnisse der Genotyp-spezifischen qPCR .....	55
2.3.	Auswertung auf Bestandsebene .....	56
2.4.	Auswertung der Bestandsergebnisse in der Verbreitung über die Bundesländer hinweg .....	56

2.5.	Geographische Verteilung der untersuchten Bestände mit Untersuchungsergebnis sowie Darstellung der jeweiligen Genotypen.....	58
2.6.	Molekularbiologische Auswertung der aufgelösten Pools (OF's) auf Bestandsebene .....	59
3.	<b>Assoziation zwischen bestandsspezifischen Faktoren und dem Nachweis PCV2 spezifischer Genomfragmente in Oral Fluids .....</b>	<b>60</b>
3.1.	Betriebsform .....	60
3.2.	Bestandsmanagement.....	60
3.2.1.	Impfregime .....	60
3.2.2.	Belegung und Zukaufsroutine .....	63
3.2.3.	Ferkelverluste und Kennzahl Therapiehäufigkeit im Zusammenhang mit dem Nachweis von PCV2-DNA in Oral Fluids .....	64
3.2.3.1.	Kategorisierte Auswertung .....	64
3.2.3.2.	Metrische Auswertung.....	65
3.2.4.	Tiergesundheitsindices im Zusammenhang mit dem Nachweis von PCV2-DNA in Oral Fluids .....	66
3.3.	Assoziation bestandsspezifischer Faktoren mit der Nachweisrate der Genotypen PCV2a, PCV2b und PCV2d in Oral Fluids .....	66
3.3.1.	Betriebsform .....	66
3.3.2.	Bestandsmanagement.....	68
4.	<b>Quantitative Auswertung der molekulargenetischen Untersuchung der Oral Fluids mittels Ct-Werten .....</b>	<b>69</b>
4.1.	Anteil der positiven Oral Fluids pro Bestand in Korrelation mit entsprechenden Ct-Werten der Einzeluntersuchungen..	70
4.2.	Assoziation der ermittelten Ct-Werte mit dem Nachweis der Genotypen PCV2a, PCV2b und PCV2d.....	71

<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>73</b>
<b>1.</b>	<b>Auswahl der Studienpopulation.....</b>	<b>73</b>
1.1.	Regionale Unterschiede in der Nachweisrate von PCV2 .....	75
1.2.	Bestandsstrukturen als Risikofaktoren für den Nachweis von PCV2.....	76
<b>2.</b>	<b>Nachweis von PCV2-spezifischen-Genomfragmenten mittels Oral Fluids.....</b>	<b>80</b>
2.1.	Oral Fluids als Ausgangsmaterial für Diagnostik .....	80
2.2.	Qualitative Auswertung des Screenings auf PCV2-Genom ...	82
2.3.	Semiquantitative Auswertung von PCV2-Genomfragmenten in randomisiert ausgewählten Beständen .....	86
<b>3.</b>	<b>Prävalenz von PCV2a, PCV2b und PCV2d.....</b>	<b>91</b>
3.1.	Assoziation der Betriebsform mit der Nachweisrate der Genotypen von PCV2.....	92
3.2.	Klinische Relevanz des Nachweises von PCV2 .....	93
<b>4.</b>	<b>Praktische Möglichkeiten von Oral Fluids zum Monitoring von PCV2 .....</b>	<b>95</b>
4.1.	Probennahme durch Landwirte.....	95
4.2.	Interpretation der erhaltenen Ct-Werte und deren Bedeutung für den gesamten Tierbestand.....	96
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>98</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>100</b>
<b>VIII.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>102</b>
<b>IX.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>104</b>
<b>X.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>106</b>
<b>XI.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>125</b>
1.	Beprobungsplan .....	125
2.	Fragebogen .....	127
3.	Betriebscharakteristika .....	130
<b>XII.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>134</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
APP	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
Bp	Basenpaare (base pairs)
bzw.	beziehungsweise
CT	Cycle threshold
D	Deutschland
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Excl.	exclusiv
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
Glässer	Glässer'sche Krankheit ( <i>Glaesserella parasuis</i> )
IAV	Influenza
IHC	Immunhistochemie
ISH	in-Situ-Hybridisierung
KA	Keine Angabe
kDa	Kilodalton
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
Min	Minuten
ml	Milliliter
M. hyo	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>
n	Anzahl
NAHMS	National Animal Health Monitoring System
nm	Nanometer
OF	Oral Fluid
OF's	Oral Fluids
ORF1	Open-Reading-Frame 1
ORF2	Open-Reading-Frame 2
ORF3	Open-Reading-Frame 3
p	Signifikanzwert
Parvo	Parvovirose
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCV	porzines Circovirus (porcine Circovirus)
PCV1	porzines Circovirus Typ 1 (porcine Circovirus)

PCV2	porzines Circovirus Typ 2 (porcine Circovirus)
PCV3	porzines Circovirus Typ 3 (porcine Circovirus)
PCV4	porzines Circovirus Typ 4 (porcine Circovirus)
PCVD	Porcine circovirus diseases
PDNS	Porzines Dermatitis und Nephropathie Syndrom
PIA	Porzine Intestinale Adenomatose (ausgelöst durch <i>Lawsonia intracellllularis</i> )
PMWS	Post-weaning-multisystemic wasting syndrome
PPV	Porzines Parvovirus
PRDC	Porcinenrespiratory disease complex
PRRSV	Porzines reproduktives und respiratorisches Syndrom Virus
qPCR	Quantitative real-time PCR
r	Korrelationskoeffizient nach Pearson
RA	<i>Rhinitis atrophicans</i>
RCA	rolling-circle-amplification
z.B.	zum Beispiel

## I. EINLEITUNG

Seit der Entdeckung des porzinen Circovirus (PCV) als Kontaminante von PK-15 Nierenzellkulturen im Jahr 1974 durch TISCHER et al. (1974) und seiner genaueren Charakterisierung (TISCHER et al., 1982) hat es eine ganze Reihe von weiteren Veränderungen der Taxonomie und Epidemiologie von porzinen Circoviren gegeben.

In den 1990er Jahren kam es in Kanada erstmals zu einem als Kümmer-Syndrom beschriebenen klinischen Bild, das später als post-weaning-multisystemic wasting syndrome (PMWS) bezeichnet wurde (HARDING & CLARK, 1997). In den erkrankten Schweinen wurden porzine Circoviren nachgewiesen, die sich jedoch genetisch deutlich von den als Zellkultur-Kontaminaten bekannten porzinen Circoviren unterschieden. Während die als Kontaminante beschriebenen Circoviren als porzines Circovirus Typ 1 (PCV1) benannt wurden, bekamen die von nun an als pathogen geltenden porzinen Circoviren aus den erkrankten Tieren den Speziesnamen porzines Circovirus Typ 2 (PCV2) (MEEHAN et al., 1998). Das porzine Circovirus Typ 2 (PCV2) stellt noch immer ein tierschutzrelevantes und wirtschaftlich bedeutendes Pathogen dar, das weltweit ubiquitär in der Hausschweinpopulation verbreitet und mit verschiedensten Krankheitsbildern und Syndromen, den porcine circovirus diseases (PCVD), verbunden ist.

Mittlerweile lassen sich acht PCV2-Genotypen (PCV2a-h) unterscheiden. Während das Neuauftreten von PCV2b (CARMAN et al., 2008) sowie PCV2d (OPRIESSNIG et al., 2013; EDDICKS et al., 2015) mit dem Aufkommen teilweise schwerer Verläufe von PCV2-assoziierten Erkrankungen auf Bestandsebene verbunden wird, werden die anderen entweder retrospektiv aus asserviertem Material nachgewiesen (PCV2c; PCV2f) (DUPONT et al., 2008; BAO et al., 2018) oder während größerer epidemiologischer Untersuchungen (PCV2e) (DAVIES et al., 2016) entdeckt, bleiben aber bislang ohne weitere klinische Bedeutung. Final werden bereits beschriebene PCV2-Stämme von FRANZO und SEGALÉS (2018) neuen Genotypen (PCV2g und PCV2h) zugeordnet.

Als relevanteste Ereignisse sind der weltweite Wandel von PCV2a zu PCV2b (CHEUNG et al., 2007; GAGNON et al., 2007; DUPONT et al., 2008) als dominierender Genotyp und der derzeit stattfindende bzw. stattgefundene Wandel von PCV2b zu PCV2d (XIAO et al., 2016; KWON et al., 2017) dokumentiert.

Die meisten Prävalenzdaten hinsichtlich des Vorkommens von PCV2-Genotypen basieren auf der Auswertung von sogenannten „klinischen Proben“, die im Rahmen der Routinediagnostik untersucht wurden. Diese Daten deuten alle darauf hin, dass der neu aufgetretene Genotyp PCV2d den derzeit am häufigsten in der Hausschweinpopulation vorkommenden Genotypen darstellt. Auswertungen der Routinediagnostik in der Klinik für Schweine zeigen ebenfalls, dass ca. 70 % der klinischen PCV2-Verdachtsproben PCV2d enthalten. Es ist jedoch unklar, ob der vermehrte Nachweis von PCV2d durch eine höhere Virulenz des Erregers oder eine Koinzidenz durch sein vermehrtes Vorkommen darstellt.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung soll mittels randomisierter Bestandsauswahl die Prävalenz von den am relevantesten eingestuften PCV2 Genotypen PCV2a, PCV2b und PCV2d ermittelt werden, um eine mögliche Überbewertung des Vorkommens von PCV2d durch die Vorauswahl klinischer Proben zu umgehen. Des Weiteren besteht dringender Informationsbedarf über das Vorkommen von PCV2-Genotypen im Feld, um zukünftigen Vakzinationsstrategien und Impfstoffe hinsichtlich ihrer Antigene anzupassen, da alle in Deutschland derzeit kommerziell verfügbaren Impfstoffe auf dem Genotypen PCV2a basieren. Zusätzlich sollen epidemiologische Fragestellungen mittels eines Fragebogens erörtert und ausgewertet werden. Für die Gewinnung von Probenmaterial werden Oral Fluids gewählt, da die Gewinnung als einfach, tierschonend und zuverlässig gilt.



## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Porzines Circovirus Typ 2**

#### **1.1. Morphologie und spezifische Eigenschaften**

Porzine Circoviren sind einzelsträngige unbehüllte Viren mit einem kovalent gebundenen, zirkulären DNA-Genom (TISCHER et al., 1982). Das Kapsid ist ikosaedrisch geformt und erstreckt sich über einen Durchmesser von 17nm (TISCHER et al., 1982).

Durch Proteinsequenz-Analyse des Porzinen Circovirus Typ 2 (PCV2) sind elf Open-Reading-Frames (ORFs) nachweisbar (HAMEL et al., 1998). Bisher sind lediglich drei dieser ORFs hinsichtlich ihrer Proteinsynthese beschrieben (SEGALÉS et al., 2019). Der Open-Reading-Frame 1 (ORF1) kodiert für Replikationsproteine wie Rep und Rep' (MANKERTZ et al., 1998). Der Open-Reading-Frame 2 (ORF2) des PCV2-Genoms wiederum kodiert für das Kapsidprotein, dieses ist 30kDa groß (NAWAGITGUL et al., 2000). Der Open-Reading-Frame 3 (ORF3) hingegen ist als kodierende Sequenz für ein Protein, welches in die Pathogenese von PCV2 involviert ist beschrieben (LIU et al., 2006).

#### **1.2. Taxonomie und Nomenklatur**

Taxonomisch werden die porzinen Circoviren (PCV) der Familie der *Circoviridae* zugeordnet (LUKERT et al., 1995).

Den porzinen Circoviren zugehörig sind das als apathogen geltende porzine Circovirus Typ 1 (PCV1) (TISCHER et al., 1986; MEEHAN et al., 1998) und das als pathogen geltende porzine Circovirus Typ 2 (PCV2) (MEEHAN et al., 1998). Als weitere Spezies ist das porzine Circovirus Typ 3 (PCV3) (PHAN et al., 2016) beschrieben. Seit Kurzem wird auch das porzine Circovirus Typ 4 (PCV4) als weitere Spezies definiert (ZHANG et al., 2019).

### **1.3. Genotypen**

Derzeit können acht Genotypen, PCV2a-h, unterschieden werden (FRANZO & SEGALÉS, 2018).

#### **1.3.1 Vorkommen und Verbreitung**

Porzine Circoviren wurden vorerst als einheitliche Virusart geführt. Bis von HARDING und CLARK (1997) das post-weaning-multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Kanada beschrieben wurde. Im Zuge dieser Untersuchung weisen sie eine Beteiligung der porzinen Circoviren an diesem klinischen Phänomen nach, allerdings ist zu diesem Zeitpunkt die Rolle von PCV an der Pathogenese des PMWS noch unklar (HARDING & CLARK, 1997). MEEHAN et al. (1998) untersuchen Proben von PMWS-auffälligen Tieren und charakterisieren die nachgewiesenen Circoviren als PCV2. Die Nukleotidsequenzen innerhalb der Gruppe dieser klinisch assoziierten Sequenzen aus Nordamerika und Europa gleichen sich zu mehr als 96%, wohingegen die Ähnlichkeit zu den Sequenzen der PK-15-Zellisolate (TISCHER et al., 1982) bei weniger als 86% liegt (MEEHAN et al., 1998). Nicht nur die Unterscheidung der Nukleotidsequenzen, sondern auch Unterschiede in den Proteinsequenzen führen MEEHAN et al. (1998) als Kriterien an, die in den erkrankten Tieren nachgewiesenen porzinen Circoviren als PCV2 zu charakterisieren. Im Gegensatz dazu werden die PK-15 Zellkulturisolate als PCV1 benannt (MEEHAN et al., 1998). Viele weitere Forschergruppen befassen sich in dieser Zeit mit der Abgrenzung der Spezies PCV2 und PCV1, die Möglichkeit einer weiteren Einteilung in Genotypen wird noch nicht in Betracht gezogen (ALLAN et al., 1999).

Erst später, im Zusammenhang mit einer schwer verlaufenden PCV2 Krankheitswelle, beobachten sowohl CHEUNG et al. (2007) als auch GAGNON et al. (2007) einen PCV2-Stamm, der sich genetisch deutlich von dem bislang bekannten PCV2-Stamm unterscheidet. Von diesem Zeitpunkt an werden erstmalig zwei Genotypen innerhalb der Spezies PCV2 unterschieden, PCV2a und PCV2b (GAGNON et al., 2007). Innerhalb der bereits unterschiedenen Genotypen lassen sich noch acht Subcluster unterscheiden (1A - 1C; 2A - 2E) (OLVERA et al., 2007).

Weitere Untersuchungen ergeben, dass sich ab circa 2004 eine Verschiebung der Nachweisrate von PCV2a zugunsten von PCV2b vollzogen hat (CARMAN et al., 2008). Die Nomenklatur der Genotypen ist zu diesem Zeitpunkt sehr diffus, viele Forschergruppen führen unterschiedliche Namen für dieselbe Kategorisierung des Virus. Einen Vorschlag zur Vereinheitlichung der Benennung veröffentlichen SEGALÉS et al. (2008), diese wird fortan verwendet. Statt der bisherigen verschiedenen Einteilung in Genotyp 1 und 2 (GRAU-ROMA et al., 2008), PCV2-Gruppe 1 und 2 (OLVERA et al., 2007) oder PCV2b und PCV2a (GAGNON et al., 2007) werden nunmehr die Sequenzen den Genotypen PCV2a und PCV2b zugeordnet (SEGALÉS et al., 2008). Retrospektive Analysen aus Dänemark zeigen, dass ein dritter Genotyp nachweisbar ist, dieser wird als PCV2c klassifiziert (DUPONT et al., 2008). Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) analysieren DUPONT et al. (2008) archivierte Serumproben aus den Jahren 1980, 1987 und 1990, diese drei Sequenzen stammen aus der Zeit vor dem Auftreten von PMWS in Dänemark. Aktuellere Erkenntnisse zeigen, dass dieser Genotyp auch in Brasilien verbreitet ist und in verwilderten Hausschweinen nachgewiesen werden kann (FRANZO et al., 2015a). Im Jahr 2010 in China beschreiben GUO et al. (2010) als vierten Genotyp PCV2d. Später wird dessen Auftreten auch in Nordamerika (OPRIESSNIG et al., 2013) und in Europa (EDDICKS et al., 2015) beschrieben. Anfänglich wurde PCV2d als PCV2b-1C bzw. mutantPCV2b beschrieben, bevor er dann als neuer Genotyp definiert wird (FRANZO et al., 2015b). Zwischenzeitlich weist eine Forschergruppe PCV2d eine erhöhte Virulenz im Vergleich zu PCV2a und PCV2b zu (GUO et al., 2012). Diese These widerlegt allerdings die Forschergruppe um OPRIESSNIG et al. (2014a) in einer Studie mit analogem Versuchsaufbau zur Untersuchung von GUO et al. (2012). Als weiterer Genotyp wird PCV2e beschrieben (DAVIES et al., 2016). Der Nachweis gelingt erstmalig in Proben, welche von Schweinen aus Mexiko und den USA stammen, im Rahmen der Routinediagnostik der Iowa State University (HARMON et al., 2015). Dieser Genotyp unterscheidet sich deutlich in Bezug auf die Nukleotidsequenz von den anderen Genotypen (DAVIES et al., 2016). Der Vergleich von PCV2e-Nukleotidsequenzen mit anderen Sequenzen aus der Datenbank der Veterinärdiagnostik der

Universität in Minnesota zeigt zur nächstähnlichen Sequenz eine Unterscheidung von 15% - 18% (DAVIES et al., 2016). Im Gegensatz dazu ist die Homologie der Nukleotidsequenzen bei anderen Genotypen deutlich höher, PCV2d gleicht PCV2b zu 92,6% - 95,3% und PCV2a zu 89,3% - 92,9% (CHAE, 2015). Seit 2018 wird auch ein sechster Genotyp beschrieben; hierbei handelt es sich um PCV2f, dieser wird aktuell besonders in Asien nachgewiesen (BAO et al., 2018). Die derzeit noch weiter beschriebenen Genotypen sind PCV2g und PCV2h, welche sich aus der Untersuchung archivierter Sequenzen der Genbank herleiten lassen (FRANZO & SEGALÉS, 2018). Die beiden letztgenannten Genotypen ergeben sich aus der Neuordnung der Nomenklatur der Genotypen von FRANZO und SEGALÉS (2018), nachgewiesene Stämme werden erst retrospektiv diesen Genotypen zugeordnet.

### **1.3.2. Veränderungen der Nachweishäufigkeit**

Das Vorkommen der derzeit beschriebenen PCV2 Genotypen ist geographisch nicht einheitlich, einige zeigen eine weltweite, andere hingegen nur eine lokale Verbreitung (FRANZO & SEGALÉS, 2018). Die Nachweisraten der verschiedenen Genotypen variieren sowohl regional als auch temporal sehr stark, die Nachweishäufigkeit verändert sich permanent (XIAO et al., 2015). Die Veränderung des vorherrschenden Genotyps von PCV2a zu PCV2b wurde von diversen Forschergruppen beschrieben, dieser Genotypen-Shift fand ab 2004 bis 2005 statt (CHEUNG et al., 2007; GAGNON et al., 2007; CARMAN et al., 2008; DUPONT et al., 2008). Die Forschergruppe um CARMAN et al. (2008) beschreiben den Wechsel des vorherrschenden Genotyps in Kanada um den Jahreswechsel 2004/2005. In einer retrospektiven Untersuchung von PCV2 positiven Proben der Jahre 2001 bis 2005 zeigen sie, dass im Jahr 2004 nur eine untersuchte Probe dem Genotyp PCV2b zuzuordnen ist, im Jahr 2005 entfallen bereits 135 auf PCV2b (CARMAN et al., 2008). Zu einem ähnlichen Schluss kommen GAGNON et al. (2007) in einer retrospektiven Untersuchung von Sequenzen aus verschiedenen Bezirken Kanadas der Jahre 2005 und 2006. Es können 79,3% der 83 PCV2-Sequenzen dem Genotyp PCV2b zugeordnet werden (GAGNON et al.,

2007). Die Veränderung der Nachweisraten von PCV2-Genotypen wird vor allem bei Betrachtung der Ergebnisse von LAROCHELLE et al. (2002), deutlich. Diese Forschergruppe weist in klinischen Fällen von 1990 bis 2001 nur PCV2a nach (LAROCHELLE et al., 2002). Die Tatsache, dass vorerst alleinig PCV2a nachgewiesen wird, ist nicht nur auf Kanada beschränkt, auch die Analyse von Sequenzen aus anderen Ländern zeigen den ausschließlichen Nachweis von PCV2a vor 2001 (LAROCHELLE et al., 2002). Auch in den USA zeigen CHEUNG et al. (2007) die Veränderung des vorherrschenden Genotyps hin zu PCV2b. Die erhöhte Nachweisrate von PCV2b zeigt sich nicht nur in Nordamerika, sondern auch in Europa (DUPONT et al., 2008). Dort beschreiben DUPONT et al. (2008) 32 dänische Bestände mit PCV2-assoziiierter klinischer Symptomatik. Im Rahmen dieser Untersuchungen können 27 verschiedene Sequenzen detektiert und phylogenetisch eingeordnet werden (DUPONT et al., 2008). DUPONT et al. (2008) vermuten des Weiteren auch, dass die Möglichkeit besteht, dass der Genotypen-Shift bereits früher erfolgt sein könnte. In Frankreich wurde von DE BOISSÉSON et al. (2004) in Proben aus den Jahren 2000 und 2001 PCV2 sowohl in klinisch auffälligen als auch in klinisch unauffälligen Beständen entdeckt. Zum Zeitpunkt dieser Untersuchung werden noch nicht zwei Genotypen definiert, die analysierten Sequenzen werden jedoch schon Clustern zugeordnet, welche sich später in den Kontext der Veränderung der Nachweisrate der Genotypen setzen lassen (DE BOISSÉSON et al., 2004). Der Wandel des vorherrschenden Genotyps hat seinen Ursprung in Europa (ROSE et al., 2012), was sich vor allem durch die zeitlichen Differenz der Nachweise von PCV2 zeigen lässt (GAGNON et al., 2007; DUPONT et al., 2008). Nicht nur in Nordamerika und Europa ist die vorherrschende Stellung von PCV2b beschrieben, auch GUO et al. (2010) zeigen in China, dass 73,7% der untersuchten Sequenzen aus 2004 bis 2008 diesem Genotyp zuzuordnen sind. Die Entdeckung der veränderten Prävalenzverhältnisse ist von einem gewissen zeitlichen Versatz geprägt, was in der Spanne zwischen Diagnostik, phylogenetischer Einordnung und Veröffentlichung begründet liegt (ROSE et al., 2012).

Analog zum Genotypen-Shift von 2003 bis 2005 von PCV2a hin zu PCV2b als dominierender Genotyp nimmt die Nachweisrate von PCV2d in den Jahren 2012 bis 2017 weltweit zu (XIAO et al., 2015). Die Erstbeschreibung dieses Genotyps geht auf GUO et al. (2010) zurück, welche das Auftreten eines neuen PCV2-Genotyps in China beschreiben. Sie ordnen diesen als PCV2d ein (GUO et al., 2010). Obwohl in dieser Studie der am häufigsten nachgewiesene Genotyp noch PCV2b ist, werden bereits drei neue Sequenzen beschrieben, welche PCV2d zuzuordnen sind (GUO et al., 2010). Das Auftreten von PCV2d wird 2012 auch in den USA beschrieben; zum Zeitpunkt der Untersuchung geht man davon aus, dass es sich hierbei um eine Mutation von PCV2b handelt (OPRIESSNIG et al., 2013). Retrospektive Untersuchungen zeigen, dass Sequenzen, welche PCV2d zuzuordnen sind, bereits 1998 in der Schweiz nachweisbar sind (XIAO et al., 2015). Diese Sequenz wird aktuell dem Cluster PCV2d-1 zugeordnet, XIAO et al. (2015) ordnen diesem Cluster nachgewiesene Sequenzen der Jahre 1998 bis 2011 zu. Des Weiteren zeigen sie, dass PCV2d-1 vor allem in Europa und China verbreitet war, während in den USA alle PCV2d-Nachweise auf das Cluster PCV2d-2 zurückgehen (XIAO et al., 2015). Bereits kurze Zeit nach der Erstbeschreibung von PCV2d-2 (XIAO et al., 2012) beschreiben XIAO et al. (2016) dieses Cluster als vorherrschend in den USA. Aus der Untersuchung von 586 routinediagnostischen Fällen mit klinischen Auffälligkeiten ergeben sich 124 Proben mit PCV2-DNA-Nachweis, hiervon sind 71,8% dem Cluster PCV2d-2 zuzuordnen. XIAO et al. (2015) beschreiben die Analyse und phylogenetische Einordnung von 1680 Sequenzen, welche zum Teil aus der Genbank heruntergeladen worden sind und zum Teil aus der Diagnostik der Iowa State University, USA stammen. In dieser Untersuchung sind 19,25% der berücksichtigten Sequenzen dem Genotyp PCV2d zuzuordnen (XIAO et al., 2015). Obwohl PCV2d erst in den Jahren 2012-2013 vermehrt nachgewiesen wird, zeigt sich eine deutliche Verschiebung der Prävalenz von PCV2b hin zu PCV2d (XIAO et al., 2015). Die phylogenetische Analyse von PCV2-Sequenzen aus der Genbank bringt auch FRANZO et al. (2016) zu dem Schluss, dass PCV2d mittlerweile der vorherrschende Genotyp ist. PCV2d scheint PCV2b aus der Schweinepopulation zu verdrängen (FRANZO et al., 2016).

## **1.4. Epidemiologie**

PCV2 kommt ubiquitär in der Hausschweinpopulation vor (SEGALÉS, 2012). Der Nachweis ist, unabhängig vom Auftreten klinischer Symptome, in allen Regionen der Erde möglich (ALLAN & ELLIS, 2000; HAMEL et al., 2000; SEGALÉS et al., 2005). Antikörper gegen PCV2 können sowohl bei klinisch erkrankten Tieren als auch bei klinisch unauffälligen Schweinen nachgewiesen werden (WALKER et al., 2000). In Beständen mit klinisch auffälligen Schweinen kommt es früher als in klinisch unauffälligen Beständen zur Serokonversion der Tiere (ROSE et al., 2003).

### **1.4.1. Übertragung**

Die Übertragung von PCV2 ist auf verschiedenste Arten möglich (ROSE et al., 2012). In üblichen Haltungssystemen, mit intensivem Tier-Tierkontakt, ist besonders die fäkal-orale oder oronasale Übertragung weit verbreitet (PATTERSON et al., 2011b). Wie BOLIN et al. (2001) zeigen, ist die Infektion naiver Schweine durch direkten Kontakt mit PCV2-positiven Schweinen möglich, hier kommt es innerhalb von drei Wochen zur Serokonversion. Eine Übertragung von PCV2 ist sowohl in vertikaler als auch horizontaler Weise möglich (PATTERSON et al., 2011a; EDDICKS et al., 2018a). PCV2-Genomfragmente sind in diversen Se- und Exkreten nachweisbar (SEGALÉS et al., 2005). Sowohl Sperma als auch Kolostrum, Harn, Speichel, Kot und Augen- bzw. Nasensekrete sind als potentiell infektiös einzuschätzen (ROSE et al., 2012). BRUNBORG et al. (2004) zeigen wie auch OLVERA et al. (2004) einen Zusammenhang zwischen der Schwere der klinischen Auffälligkeiten und der Höhe der Virusmenge in Serumproben oder infizierten Geweben. Beobachtungen bei natürlichen Infektionen zeigen, dass bis zu 181 Tage nach Virusexposition Genomfragmente sowohl in Maul-, Nasen- und Kottupfern als auch in Blutserumproben nachweisbar sind (PATTERSON et al., 2011a). SIBILA et al. (2004) zeigen, dass der Prozentsatz der Tiere, welche PCV2 ausscheiden, im Alter von 11-20 Wochen am höchsten ist; daher ist davon auszugehen, dass die Übertragung bereits vor diesem Lebensabschnitt im Ferkelalter sehr weit verbreitet ist. PCV2 ist nicht nur

in klinisch erkrankten Schweinen nachweisbar, auch unauffällig wirkende Tiere können als Vektor für eine Verbreitung dienen (BOLIN et al., 2001).

Für die Übertragung von PCV2 spielt die horizontale Verbreitung eine wichtige Rolle, allerdings ist auch die vertikale Übertragung bewiesen (ROSE et al., 2012). DVORAK et al. (2013) zeigen in einer Untersuchung von sechs konventionellen Beständen, welche in allen Produktionsstufen positiv für PCV2-spezifische-Genomfragmente oder Antikörper sind, die Risiken der Exposition von PCV2 sowie die Dynamik der Übertragung und die immunologischen Auswirkungen auf die Säugeperiode. Bereits 63% präkolostral gewonnener Blutserumproben sind positiv für PCV2-Genom (DVORAK et al., 2013). Dies bekräftigt die These, dass die Infektion der Neugeborenen mit PCV2 bereits intrauterin geschehen sein muss (DVORAK et al., 2013). Im Gegensatz zu diesen hohen Prävalenzen von PCV2 in neugeborenen Ferkeln zeigen europäische Gruppen ein gegenteiliges Bild (EDDICKS et al., 2016; DIESTE-PÉREZ et al., 2018). In der Untersuchung von 20 süddeutschen Sauenbeständen unter Feldbedingungen analysieren EDDICKS et al. (2016) sowohl den serologischen Status der Sauen als auch die Ausscheidung von PCV2-Genomfragmenten, zusätzlich werden die zugehörigen Ferkel mittels Blutuntersuchung vor Kolostrumaufnahme und 24 Stunden nach der Geburt beprobt. Es wird gezeigt, dass in keinem der 580 präkolostral gewonnenen Seren PCV2-Genomfragmente nachweisbar waren (EDDICKS et al., 2016). Eine niederländische Untersuchung kommt zu einem ähnlichen Schluss, auch hier wird bei keinem der präkolostral untersuchten Ferkel PCV2-DNA gefunden (DIESTE-PÉREZ et al., 2018). Diese Studie umfasste die Beprobung von Schweinebeständen unter „europäischen Bedingungen“, als Auswahlkriterien der Bestände wird aufgeführt, dass in der Vergangenheit PCV2 nachgewiesen wurde, aktuell allerdings keine klinischen Auffälligkeiten vorliegen und keine Sauenimpfung gegen PCV2 durchgeführt wird, dass Jungsauen eigenremontiert werden, und dass mindestens 50 Sauen in einer Abferkelgruppe im Ein-Wochen-Rhythmus zur Verfügung stehen (DIESTE-PÉREZ et al., 2018). Die Autoren der zuvor genannten Untersuchungen kommen zu dem Schluss, dass virämisch geborene



Ferkel in Europa eher selten sind (EDDICKS et al., 2016; DIESTE-PÉREZ et al., 2018). Eine Infektion peri- oder postpartal ist deutlich wahrscheinlicher (EDDICKS et al., 2016). Als mögliche Ansteckungsquellen können hierzu sowohl jegliche Se- und Exkrete der Muttersau als auch das Umfeld der Tiere in Betracht gezogen werden (DVORAK et al., 2013). GERBER et al. (2011) führen als mögliche Ansteckungsquelle für Ferkel die Milch und vor allem das aufgenommene Kolostrum auf. PCV2-DNA kann sowohl in der Milch geimpfter wie auch in ungeimpften Sauen nachgewiesen werden (GERBER et al., 2011).

#### **1.4.2. Einflussfaktoren auf die Verbreitung von PCV2**

Als Risikofaktoren für den Ausbruch oder das Auftreten PCV2-assoziiierter Erkrankungen oder Syndrome wie dem PMWS, werden verschiedene Managementfaktoren wie kurze Leerstände in den Aufzuchtbetrieben oder große Stallungen beschrieben (ROSE et al., 2003). Zusätzlich beschreiben ROSE et al. (2003) den Nachweis anderer Pathogene, wie das porcine Parvovirus (PPV) oder das porcine reproduktive und respiratorische Syndrom Virus (PRRSV) in Kombination mit PCV2 als möglichen Risikofaktor für PMWS. WOODBINE et al. (2007) zeigen auch diverse Faktoren auf, die positiv mit der Verbreitung von PCV2 assoziiert sind. Beispielsweise ist in Beständen, die mehr als 600 Sauen halten, die Wahrscheinlichkeit für einen PCV2 spezifischen Genomfragment-Nachweis höher als in kleinstrukturierten Beständen (WOODBINE et al., 2007). Diese Forschergruppe beschreibt auch eine höhere Gefährdung, mit PCV2 in Kontakt zu kommen, durch Besucher, welche Schweinekontakt im Vorfeld nicht vermieden haben (WOODBINE et al., 2007). Auch geographische Gegebenheiten können ein Risikofaktor für eine Infektion mit PCV2 sein; Bestände, die im Umkreis von 8km um einen klinisch auffälligen PMWS-Bestand liegen, haben ein erhöhtes Risiko für eine Infektion des Bestandes mit PCV2 (WOODBINE et al., 2007). Auch MADEC et al. (1999) beschäftigen sich mit einem 20 Punkte umfassenden Plan mit Bekämpfungsmaßnahmen gegen PCV2. Dieser umfasst vorrangig Managementoptimierungen wie Stallklima, Immunprophylaxe und Zusammenstallung der Tiere (MADEC et al.,

1999). Zusätzlich sind darin auch Hygienemaßnahmen aufgeführt, welche sich besonders auf die Umgebung der Tiere beziehen (MADEC et al., 1999). Der Nachweis des Virus ist nicht nur in der direkten Tierumgebung, sondern auch im gesamten umgebenden Bereich der Schweinebestände möglich (LÓPEZ-LORENZO et al., 2019). In dieser Untersuchung wird beschrieben, dass auch in Tüpfeln sowohl der Lager- und Büroräume als auch der Arbeiter der Betriebe, besonders deren Arbeitstiefeln, PCV2-spezifische-Genomfragmente nachweisbar sind (LÓPEZ-LORENZO et al., 2019). Um eine innerbetriebliche Ausbreitung des Virus zu minimieren, sind deshalb besondere Hygiene- und Biosicherheitsmaßnahmen sowohl an Gegenständen mit direktem Tierkontakt als auch in Bereichen ohne jeglichen Schweinekontakt, die sich nur in räumlicher Nähe zum Bestand befinden, absolut notwendig (LÓPEZ-LORENZO et al., 2019).

#### 1.4.3. Nachweisraten von PCV2

Diverse Arbeiten untersuchen das Vorkommen von PCV2. In Tabelle 1 sind die Studienergebnisse zur Nachweisrate von PCV2 und dessen Genotypen aufgeführt.

**Tabelle 1: Nachweisraten von PCV2 und dessen Genotypen verschiedener nationaler und internationaler Autoren**

Zeit- raum	Land	Nachweis- rate	Genotypen	unter- suchte Bestände	Literatur
2016 - 2018	USA	16,4% gesamt 2018: 28,8% 2017: 14,4%	PCV2a: 16,3% PCV2b: 11,6% PCV2d: 72,1%	(klin.+)¹ und (klin.-)²	(WANG et al., 2020)
2015 - 2018	Nordost- China	50%	PCV2a: 13,6% PCV2b: 25,8% PCV2d: 60,6%	(klin.+)¹ und (klin.-)²	(XIA et al., 2019)

2015			79,1% PCV2a		
-	Zentral-China	57,01%	8,6% PCV2b	(klin. PCV2) <sup>4</sup>	(XU et al., 2019)
2017			12,3% PCV2d		
2015		36,30%	PCV2a: 26,95%		
-	Korea	sehr viele Ko- infektionen	PCV2b: 23,1%	(klin.+) <sup>1</sup>	(KIM et al., 2018)
2016			PCV2d: 90,1%		
2015	Deutschland	42,40%	PCV2a: 53,3%		
			PCV2b: 34,9%	(klin.+) <sup>1</sup>	(EDDICKS et al., 2018b)
			PCV2d: 11,6%		
2014			PCV2a: 23,1%		
-	Nordost-Indien	62,25%	PCV2d: 46,2%	(klin.+) <sup>1</sup> und	(MUKHERJEE et al., 2018)
2016			30,8% rekombi- nante Sequenzen	(klin.-) <sup>2</sup>	
2010	Europa (AUT, DEU, HUN, ESP, SWE)	42,2%, Deutschland 11,4%	KA	49 Bestände (Deutsch- land, n=3)	(ZHOU et al., 2016)
-				Bestände aus Monito- ring:	
2010			PCV2a: 7,9%		
-	Uruguay	40,3%	PCV2b: 10,5%	92 (klin.+) <sup>1</sup> ,	(RAMOS et al., 2017)
2014			PCV2d: 29%	26 (klin.-) <sup>2</sup> ,	
				36 (klin.?) <sup>3</sup>	

2012	USA	Mast: 17,2%	Mast: PCV2a: 17,5% PCV2b: 80,4% PCV2a+b: 2,1%	Bestände aus Monito- ring	(DVORAK et al., 2016)
2010 - 2011	USA	16,10%	PCV2a: 47,8% PCV2b: 52,2%	61 Bestände	(SHEN et al., 2012)
2006	USA	82,6% 99,5% der Bestände		Monito- ring	(PUVANENDIR AN et al., 2011)
2002 - 2011	Taiwan	4,7%	02 - 07: PCV2a: 40% PCV2b: 60% 08-11: PCV2b: 31,3 % PCV2d: 68,8%	(klin. PCV2) <sup>4</sup>	(CHIOU et al., 2012)
2000 - 2001	Frank- reich	(klin. PCV2) <sup>4</sup> 100%, (klin.-) <sup>2</sup> : 76%	KA	(klin. PCV2) <sup>4</sup> und (klin.-) <sup>2</sup>	(DE BOISSÉSON et al., 2004)
1999 - 2001	Bayern	61,0%	KA	(klin.+) <sup>1</sup>	(RITZMANN et al., 2002)
1998	Bran- denburg	14,7%	KA	zufällig ausge- wählter Bestand	(MANKERTZ et al., 2000)

			86 - 03: PCV2a: 74,1%		
1973	Schweiz	74,60%	PCV2b: 25,9%	retro- spektiv (klin.+) <sup>1</sup>	(WIEDERKEHR et al., 2009)
-			03 - 05: PCV2a: 9,5%		
2005			PCV2b: 90,5%		
1961	Nord- deutsch- land	61 - 84 2,77%,	KA	retro- spektiv (klin.+) <sup>1</sup>	(JACOBSEN et al., 2009)
-		85 - 98			
1998		32,14%			

Legende: <sup>1</sup>Bestände mit klinischen Auffälligkeiten  
<sup>2</sup>Bestände ohne klinische Auffälligkeiten  
<sup>3</sup>Bestände mit unklarem Gesundheitsstatus  
<sup>4</sup>Bestände mit PCV2 assoziierten klinischen Auffälligkeiten

### 1.5. Vakzination

Die Impfung gegen PCV2 reduziert die Höhe der Virämie sowie die Anzahl virämischer Schweine in geimpften Beständen (KIXMÖLLER et al., 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Ko-Infektionen signifikant geringer ist als bei nicht geimpften Schweinen (KIXMÖLLER et al., 2008). Da die Höhe der Virämie und das Vorkommen von Ko-Infektionen positiv mit dem Auftreten PCV2-bedingter klinischer Anzeichen einhergeht (BRUNBORG et al., 2004; OLVERA et al., 2004), erreicht die Impfung eine deutliche Verbesserung der Tiergesundheit und Wirtschaftlichkeit. Die nachweisbare Menge an PCV2-spezifischen-Genomfragmenten wird durch die Impfung massiv verringert, es handelt sich lediglich noch um die Menge, welche beim Nachweis in subklinisch infizierten Beständen zu erwarten ist (KIXMÖLLER et al., 2008). Die Zirkulation von Feldstämmen kommt nicht zum Erliegen, diese können weiterhin zu subklinischen Erkrankungen führen (AFGHAH et al., 2017). DVORAK et al. (2016) zeigen in einer Untersuchung, die im Rahmen des National Animal Health Monitoring System (NAHMS) zur Schweine-Gesundheits-Erhebung durchgeführt wurde, dass die flächendeckende

Impfung gegen PCV2 in den USA die Prävalenz deutlich vermindert hat. Die Nachweisrate von PCV2-spezifischen-Genomfragmenten bei Mastschweinen lag im Jahr 2012 bei 17,2% und bei 8,8% bei Sauen (DVORAK et al., 2016). In einer analog aufgebauten Untersuchung aus dem Jahr 2006 vor der flächendeckenden Impfung lag die Nachweisrate von PCV2-DNA in Serumproben aus Mastbeständen bei 82,6% (PUVANENDIRAN et al., 2011). Diese deutliche Reduktion des Anteils virämischer Tiere bei den Untersuchungen in den USA zeigen die Wirksamkeit der flächendeckenden Impfung gegen PCV2 (DVORAK et al., 2016). Diese These stützt auch die weitere Betrachtung der Bestände ohne jeglichen Nachweis von PCV2-Genomfragmenten obengenannter Untersuchungen. DVORAK et al. (2016) zeigen im Jahr 2012, dass bei 52,1% der untersuchten Mastbestände und bei 66,7% der Ferkelerzeuger der Nachweis von PCV2-Genomfragmenten in Serumproben nicht möglich ist. Im Gegensatz dazu betrachten PUVANENDIRAN et al. (2011) in der Untersuchung von 2006 lediglich 0,5% der Mastbestände als negativ. Diese deutliche Erhöhung der Bestände ohne PCV2-Nachweis ist ein weiterer positiver Effekt der flächendeckenden Impfung gegen PCV2 (DVORAK et al., 2016). DVORAK et al. (2016) geben an, dass die Reduktion der Nachweisrate von PCV2 wie auch die Minimierung der klinischen Auffälligkeiten auf die Einführung der PCV2-Impfung zurückzuführen ist. Auch Studien aus Deutschland zeigen eine überragende Verbesserung der Herdengesundheit sowohl bei PCV2-assoziierten respiratorischen Problemen als auch bei Auffälligkeiten wie PMWS (FACHINGER et al., 2008; KIXMÖLLER et al., 2008). FACHINGER et al. (2008) zeigen in ihrer placebo-kontrollierten Feldstudie, dass bereits der einmalige Einsatz eines Impfstoffs zu einer geringeren Mortalität, höheren Tageszunahmen und einer kürzeren Zeit bis zur Vermarktung führt (FACHINGER et al., 2008).

Da die Impfung gegen PCV2 in der Reduktion von klinischen Auffälligkeiten sehr gute Ergebnisse bewirkt, wird oft die Möglichkeit der Eradikation von PCV2 durch Massenimpfung diskutiert (FENG et al., 2014). FENG et al. (2014) überprüfen diese Hypothese, indem sie in einem Bestand kontinuierlich alle Jungsauen, Sauen und Eber impfen,

auch die Ferkel dieses Bestands werden zweimalig gegen PCV2 geimpft. Diese Maßnahmen wurden für einen Zeitraum von einem Jahr durchgeführt. Labordiagnostisch ergab die Untersuchung der Sauen, dass im kompletten Versuchszeitraum in keiner der untersuchten Serum-Proben PCV2-spezifische-Genomfragmente nachweisbar waren, wobei allerdings zu Beginn der Anteil seropositiver Sauen höher als zum Ende des Versuchszeitraums war (FENG et al., 2014).

Die Untersuchung der Ferkel mittels Serumproben zeigte eine signifikante Reduktion der Nachweisrate von PCV2-DNA im Zeitraum der Massenimpfung (FENG et al., 2014). Als Vergleichsgruppen für diese Verringerung der Nachweisrate von PCV2-spezifischen-Genomfragmenten können Beprobungen sowohl vor als auch nach der Maßnahme herangezogen werden (FENG et al., 2014). Diese Nachweisrate ist in allen beprobten Altersgruppen reduziert (FENG et al., 2014). Die konsequente Massenimpfung des Bestands zeigte sich insofern effizient, als dass zum Ende des Versuchszeitraums der Infektionsdruck signifikant reduziert war und mittels konventioneller PCR Untersuchung keine PCV2-spezifischen-Genomfragmente mehr nachweisbar waren (FENG et al., 2014). Allerdings konnte bereits kurz nach Ende dieser Maßnahmen wieder PCV2-DNA gefunden werden, dieser Modellversuch zeigt, dass eine Eradikation von PCV2 mittels Massenimpfung nicht möglich ist (FENG et al., 2014).

### 1.6. Krankheitsbilder assoziiert mit PCV2

Einhergehend mit der Infektion mit PCV2 können verschiedene klinische Auffälligkeiten auftreten (SEGALÉS, 2012). Diese Erkrankungen werden unter dem Begriff der porcine circovirus diseases (PCVD) zusammengefasst (HARDING, 2007; SEGALÉS, 2012). Der alleinige Nachweis von PCV2 in erkrankten Tieren ist nicht immer als monokausale Ätiologie zu sehen, viele Erkrankungen, welche im Zusammenhang mit PCV2 stehen, haben multifaktorielle Ursachen (SEGALÉS et al., 2005).

Zu PCVD werden neben den Erkrankungen einzelner Organgruppen wie den enteralen, respiratorischen und reproduktionstechnischen Erkrankungen auch systemische klinische Auffälligkeiten gezählt wie das post-weaning-multisystemic wasting syndrome (PMWS) und das porcine Dermatitis und Nephropathie Syndrom (PDNS) (SEGALÉS, 2012).

Zusätzlich kann PCV2 auch mit dem porcine respiratory disease complex (PRDC) in Verbindung gebracht werden (HARMS et al., 2002; KIM et al., 2003). In einer retrospektiven Untersuchung klinisch auffälliger Tiere mit respiratorischen Symptomen zeigten KIM et al. (2003) eine erhöhte Nachweisrate von PCV2. PCV2 ist äußerst weit verbreitet bei Tieren, die Symptome des PRDC aufweisen, deshalb ist PCV2 als Hauptpathogen dieses Krankheitskomplexes zu sehen (KIM et al., 2003). Klinisch an PRDC erkrankte Tiere zeigen sowohl Atemnot und Husten in chronischer oder akuter Ausprägung wie auch pathologische Veränderungen des Lungengewebes (HARMS et al., 2002). Zumeist zeigt sich eine interstitielle Pneumonie mit peribronchialer Fibrose und Makrophageninfiltration, im Lungengewebe ist PCV2 nachweisbar (HARMS et al., 2002). Auch durch Befundung von Schlachtkörpern kann der Zusammenhang zwischen Lungenläsionen und PCV2-Nachweis bestätigt werden (WELLENBERG et al., 2010). Ein erhöhtes Aufkommen von Pneumonien und Pleuritiden kann mit dem Nachweis von PCV2 in Verbindung gebracht werden (WELLENBERG et al., 2010).



## 2. Diagnostik

Die ubiquitäre Natur und die diversen Ausprägungen der klinischen Assoziationen von PCV2 machen die Auswahl der Diagnostikmethode und noch vielmehr die Interpretation dieser äußerst schwierig (OPRIESSNIG et al., 2007). PCV2 kann sowohl bei erkrankten als auch in klinisch unauffälligen Tieren nachgewiesen werden (ALLAN & ELLIS, 2000).

Einerseits können Antikörper gegen PCV2 detektiert werden, hierzu beschreiben WALKER et al. (2000) einen Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Mit dieser Methode zeigen sie, dass 55-100% der untersuchten Proben, welche aus Überwachungsuntersuchungen der Jahre 1973 bis 1999 aus Nordirland stammen, Antikörper gegen PCV2 aufweisen (WALKER et al., 2000).

Andererseits ist auch der direkte Nachweis von Virusmaterial bzw. Genomfragmenten oder anderen Teilen des Virus möglich (OPRIESSNIG et al., 2007). Labordiagnostisch gibt es verschiedenste Ansätze, PCV2 im Gewebe oder Se- und Exkreten nachzuweisen (BOLIN et al., 2001; PARK et al., 2005; PATTERSON et al., 2011a). Auf porzinen PK-15 Nierenzelllinien kann das Virus angezüchtet und isoliert werden (TISCHER et al., 1982; ELLIS et al., 1998). Hierzu werden in der Regel Organhomogenate auf Nierenzellnährböden gegeben und über mehrere Tage inkubiert (ALLAN et al., 1998). Aufgrund der Eigenschaft, dass PCV2 keinen zytopathogenen Effekt auf diese Zellen hat, muss sich der Kultivierung noch eine Nachweismethode zur Bestätigung der Anreicherung anschließen (ALLAN et al., 1998). Hierfür sind sowohl die Elektronenmikroskopie als auch die in-Situ-Hybridisierung (ISH) mögliche Alternativen zur Bestätigung der Anreicherung von PCV2 (ALLAN et al., 1998). Da für die Nachweismethode des direkten Virusnachweises mittels Virusisolation die Vermehrungsfähigkeit des Erregers im eingesandten Probenmaterial erhalten sein muss und sie sehr aufwändig ist, gehört sie nicht zur Routinediagnostik (KIM & CHAE, 2004). Eine weitere Methode des direkten Virusnachweises ist die elektronenmikroskopische Untersuchung des Probenmaterials (OPRIESSNIG et al., 2007). Hierbei werden circovirus-ähnliche

Strukturen innerhalb der Zellen dargestellt, da diese Art der Diagnostik sowohl sehr zeit- und kostenintensiv als auch wenig sensitiv ist, wird sie nicht standardmäßig verwendet (OPRIESSNIG et al., 2007). Ein weiteres Nachweisverfahren stellt die in-Situ-Hybridisierung (ISH) dar, hierbei kann in Gewebeschnitten bevorzugt aus lymphatischem Gewebe oder der Lunge, der Leber, der Niere oder dem Pankreas PCV2-Genom nachgewiesen werden (ROSELL et al., 1999). Zur Detektion dieser Fragmente werden einzelsträngige DNA-Oligonukleotidsequenzen verwendet, welche spezifisch an Genomteile von PCV2 binden (ROSELL et al., 1999). Diese Bindung wird nach mehreren Waschschritten durch einen enzymmarkierten Antikörper detektiert (ROSELL et al., 1999).

Die aktuell geläufigste diagnostische Methode zur Detektion von PCV2-spezifischen-Genomfragmenten ist die Polymerase Chain Reaktion (PCR) (SEGALÉS, 2012). Verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit dieser Methodik zum Nachweis von PCV2-spezifischer Nukleinsäure (HAMEL et al., 2000; SHIBATA et al., 2003). Für diese Art der Untersuchung sind verschiedenste Ausgangsmaterialien möglich. PCV2-Genomfragmente sind in sämtlichen Organen nachweisbar, wie zum Beispiel dem Herz, dem Pankreas, der Leber, dem Ileum, der Niere und der Nebenniere (BOLIN et al., 2001). Besonders hohe Mengen an PCV2 spezifischen Nukleinsäuren weisen BOLIN et al. (2001) vor allem in lymphatischen Geweben nach. Für den Nachweis von PCV2 -DNA mittels PCR eignen sich zusätzlich auch Blut, sowohl Vollblut als auch Serum, wie auch Nasensekret und Kot (SHIBATA et al., 2003). Als weiteres Probenmaterial für den PCV2-Genomnachweis mittels PCR sind Oral Fluids (OF's) beschrieben, diese sind auch besonders für eine epidemiologische Untersuchung eine praktikable Option (PRICKETT et al., 2011).

## **2.1. PCR**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) etabliert sich in den letzten Jahren als Standarduntersuchungsmethode, da dies eine schnelle und kostengünstige Methode PCV2 nachzuweisen ist (HAMEL et al., 2000; OPRIESSNIG & LANGOHR, 2013). Als Primer für die PCR werden

Oligonukleotidfragmente verwendet, welche sich aus Bestandteilen bereits analysierter PCV2-Sequenzen zusammensetzen (HAMEL et al., 2000). Bereits sehr kurze Zeit nach der Erstbeschreibung von PCV2 zeigen HAMEL et al. (2000), dass mittels PCR sowohl der Nachweis von PCV1 als auch von PCV2 möglich ist. Um eine vollständige Analyse und auch Zuordnung der nachgewiesenen Genomfragmente vornehmen zu können, werden diese mittels Gelelektrophorese untersucht und dargestellt (HAMEL et al., 2000).

Eine Verbesserung dieser diagnostischen Methode stellt die Entwicklung der quantitativen real-time PCR dar, da ein zusätzlicher Schritt zur Darstellung der PCR-Produkte nicht mehr notwendig ist (HEID et al., 1996). Für diese Methodik wird eine markierte Fluoreszenzsonde zur Detektion der DNA-Vermehrung verwendet, was nicht nur den Vorteil der schnelleren Auswertung erbringt, sondern auch Übertragungsfehler und Kontaminationsquellen minimiert (HEID et al., 1996). BRUNBORG et al. (2004) veröffentlichen eine neuartige TaqMan-basierte PCR, bei der die Sonden auf dem open reading frame 2 (ORF2) von PCV2 basieren. Diese PCR wird mittels Untersuchungsmaterial aus zwei klinisch auffälligen Beständen erprobt (BRUNBORG et al., 2004). Hierfür werden einerseits Serumproben verwendet, andererseits werden Tupfer, welche während der Sektion von Organen genommen wurden, analysiert (BRUNBORG et al., 2004). Zu dieser Zeit befassen sich verschiedenste Forschergruppen mit der Weiterentwicklung dieser diagnostischen Möglichkeit PCV2-Genom nachzuweisen. Auch OLVERA et al. (2004) veröffentlichen das Untersuchungsprotokoll für eine PCR. Diese TaqMan-basierte PCR wird anhand von asservierten Serumproben, welche von Tieren stammen, die mittels ISH bereits als PCV2 positiv eingestuft wurden, entwickelt (OLVERA et al., 2004). ZHAO et al. (2010) zeigen mit ihrer TaqMan-basierten real-time PCR eine weitere Möglichkeit auf, die bisherigen PCR-Verfahren für die Detektion und Quantifizierung von PCV2 zu verbessern. Eine Quantifizierung der nachgewiesenen PCV2-spezifischen-Genomfragmente ist mit all diesen verschiedenen PCR-Protokollen möglich (BRUNBORG et al., 2004; OLVERA et al., 2004; ZHAO et al., 2010). Eine Assoziation zwischen der detektierten PCV-

DNA-Menge und dem Auftreten klinischer Auffälligkeiten zeigen GRAU-ROMA et al. (2009). Diese These wird auch von BRUNBORG et al. (2004) gestützt, auch in dieser Untersuchung korreliert die nachgewiesene Genommenge von PCV2 in Serum und Gewebe mit dem klinischen Bild einer PCV2-Infektion. Basierend auf diesen Untersuchungen, kann bereits mit dem Ergebnis der PCR-Untersuchung auf das klinische Geschehen im Bestand geschlossen werden (OPRIESSNIG et al., 2007).

## **2.2. Genotyp-spezifische PCR**

Eine Zuordnung zu den jeweiligen Genotypen kann über eine Kombination von differenzierenden real-time-PCRs erfolgen (OPRIESSNIG et al., 2010). Dazu werden aufeinanderfolgend zwei verschiedene PCRs verwendet.

OPRIESSNIG et al. (2010) beschreiben eine Multiplex-PCR, welche geeignet ist, PCV2a und PCV2b zu unterscheiden. Hierfür werden ein Vorwärts- (50-GCAGGGCCAGAATTCAACC-30) und ein Rückwärts-Primer (50-GGCGGTGGACATGATGAGA-30) sowie speziell farbcodierte Sonden für die jeweiligen Genotypen, welche auf kapsid-codierenden Sequenzen beruhen, verwendet (OPRIESSNIG et al., 2010). Eine weitere Multiplex-PCR zur Differenzierung von PCV2a und PCV2b wird von GAGNON et al. (2008) beschrieben. Als Basis der hier angewandten Primer werden Gensequenzen, welche aus der Genbank heruntergeladen wurden, benutzt (GAGNON et al., 2008).

## **2.3. Sequenzierung**

Unter der Sequenzierung des Genoms versteht sich im Allgemeinen die Bestimmung der genauen Anordnung der Nukleotide innerhalb des DNA-Moleküls (BISHT & PANDA, 2014).

Innerhalb von PCV2 variiert die Genomlänge der verschiedenen Genotypen. PCV2b, PCV2c, PCV2d und PCV2f weisen eine Länge von 1767 base pairs (bp) auf (CHEUNG et al., 2007; GUO et al., 2010; BAO et al., 2018). PCV2a hingegen weist nur eine Länge 1768bp auf (CHEUNG et al., 2007). Im Gegensatz dazu ist PCV2e der Genotyp mit dem längsten

Genom von 1777bp. Hierbei ist auch zu beachten, dass die genetische Divergenz zu den anderen Genotypen als durchaus weit zu bezeichnen ist (DAVIES et al., 2016). Aufgrund der geringen Genomgröße von PCV2 ist eine Vollgenomanalyse umsetzbar (GAGNON et al., 2007). Sequenzanalysen von PCV2 zeigen einen sehr nahen phylogenetischen Verwandtschaftsgrad innerhalb dieser Spezies, denn die Ähnlichkeit der Nukleotidfolge liegt bei mehr als 93% (OLVERA et al., 2007). Für phylogenetische Analysen und epidemiologische Einordnungen zeigt sich aber, dass die Sequenz des Open-Reading-Frame 2 (ORF2) ausreichend für eine eindeutige Zuordnung ist (OLVERA et al., 2007).

Für die Amplifikation des Genstrangs werden zwei verschiedene Primer verwendet (PCV\_Seq2F 50-TGT TTT CGA ACG CAG TGC C und PCV\_Seq2R 50-CCG TTG TCC CTG AGA TCT AGG A), diese produzieren überlappende Fragmente von 1245 bzw. 1045bp (GAGNON et al., 2007).

Die analysierten Sequenzen werden mit Referenzsequenzen abgeglichen und können somit einen Anhaltspunkt für die taxonomische und phylogenetische Einordnung geben (FRANZO et al., 2015b). Eine Einordnung von verschiedenen Sequenzen ist in der Regel eindeutig möglich, manchmal können Genomsequenzen aber auch nur einer intermediären Gruppe zugeordnet werden (OLVERA et al., 2007). Die Zuordnung zu den verschiedenen Genotypen und Clustern innerhalb von PCV2 ist eine besondere Herausforderung (FRANZO et al., 2015b).

FRANZO und SEGALÉS (2018) zeigen in ihrer Reorganisation der Eingruppierung der Genotypen von PCV2 auf, dass bisher analysierte Sequenzen unter dem Gesichtspunkt der gegenseitigen Ähnlichkeit mit einer geringen p-Distanz in 18 Cluster zu unterteilen sind, woraus sich acht Genotypen ergeben. Im Rahmen dieser Analyse wurde eine neue Definition der Genotypen veröffentlicht, diese setzt sich aus drei Eckpunkten zusammen: Die p-Differenz der Sequenzen innerhalb eines Genotyps darf maximal 13% betragen, die Zuordnung der Sequenzen muss statistisch mit mindestens 70% Verlässlichkeit nach Prüfung durch Bootstrap haltbar sein und schließlich müssen mindestens 15 Sequenzen dieses Genotyps verfügbar sein (FRANZO & SEGALÉS, 2018).

### 3. Oral Fluids

Oral Fluids (OF's) sind gerade in Schweinemastbeständen eine einfache Möglichkeit, um an Probenmaterial zur Diagnostik zu kommen (HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017). Besonders für die Beprobung größerer Tiergruppen oder zur Untersuchung gesamter Bestände eignen sich OF's (HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017). Bereits CORTIER et al. (1976) verwenden in einer Untersuchung zur Schweinepest OF's. PRICKETT und ZIMMERMAN (2010) zeigen in ihrem Review diverse Möglichkeiten der Nutzung von OF's zu Diagnostikzwecken auf. Einerseits beschreiben sie die Möglichkeit der Detektion von Antikörpern, andererseits auch den direkten Nachweis von Virusgenom (PRICKETT & ZIMMERMAN, 2010). Oral Fluids können in sämtlichen Bereichen der Human- und Veterinärmedizin genutzt werden, besonders im Bereich der Schweinemedizin ist diese Probennahme äußerst praktikabel (PRICKETT & ZIMMERMAN, 2010). Die natürliche Neugierde der Schweine und der Drang, neue Gegenstände mit dem Maul zu erkunden, unterstützt diese Methode der Probennahme (DAY et al., 1995; KITTAWORNAT & ZIMMERMAN, 2011).

#### 3.1. Möglichkeiten der Nutzung von Oral Fluids

Die Beprobung mittels Kaustricken zur Gewinnung von Oral Fluids ist eine vielversprechende Möglichkeit, Schweinebestände effektiv und kostengünstig hinsichtlich möglicher Krankheitserreger zu überwachen (RAMIREZ et al., 2012; OLIVER-FERRANDO et al., 2016). Besonders Pathogene, welche im Zusammenhang mit dem porzinen respiratorischen Krankheitskomplex zu nennen sind, stehen im Fokus der Diagnostik mittels Oral Fluids (HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017). Der Nachweis von porzinen reproduktiven und respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV), *Mycoplasma hyopneumonie* (M. hyo), Influenza und auch PCV2 ist in konventionellen Beständen über OF's möglich, es können sowohl subklinische als auch klinisch apparente Infektionen detektiert werden (HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017).

Oral Fluids sind hinsichtlich der diagnostischen Auswertung von PCV2 äußerst effizient, sie sind eine gute Möglichkeit zur Diagnostik von PCV2-Antikörpern (PRICKETT et al., 2011). Des Weiteren erweisen sie sich auch für den Nachweis von PCV2-spezifischen-Genomfragmenten zur genetischen Charakterisierung und zur Überwachung der Zirkulation von PCV2 in Beständen als geeignet (PRICKETT et al., 2008). Der Nachweis von PCV2-Genomfragmenten in Oral Fluids gelingt nach experimenteller Infektion bis 98 Tage nach Erregerexposition mit einer Menge von  $10^{5,6}$  Genomkopien pro ml (PRICKETT et al., 2011).

Eine Beprobung der gleichen Tiergruppe zu verschiedenen Zeitpunkten zeigt, dass die Nachweisrate mit dem Alter der Tiere positiv korreliert. PRICKETT et al. (2008) zeigen, dass bei 16 Wochen alten Schweinen alle beprobten Buchten PCV2-spezifische-Genomfragmente aufweisen. Um eine möglichst aussagekräftige Diagnostik für den Bestand durchführen zu können, ist es einerseits wichtig, die Charakteristika wie Ausscheidungsdauer und -intensität der zu untersuchenden Pathogene zu berücksichtigen und andererseits auch auf die Sensitivität der angeschlossenen labordiagnostischen Tests zu achten (HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017).

### **3.2. Ablauf der Probengewinnung von Oral Fluids**

Für die Beprobung mittels Kaustrieken ist eine Gruppengröße von 17 bis 24 Schweinen pro Bucht auf einen bis zwei Kaustricke am effizientesten (SEDDON et al., 2012). Bereits nach 45min haben Untersuchungen von SEDDON et al. (2012) zufolge mindestens 80% der Tiere aus der zu beprobenden Gruppe Speichelkontakt mit dem Diagnostiktool. Auch die Forschergruppe um NIELSEN et al. (2018) beschäftigt sich mit der Anzahl der zu beprobenden Schweine pro Bucht zur Diagnose von PCV2 in Mastbeständen. Im Vergleich zwischen Probenmaterial aus Oral Fluid Beprobung von bis zu 30 Schweinen pro Kaustrick und aus gepoolten Serumproben (vier bis fünf Serumproben pro Pool) ergibt sich eine größere Menge von nachweisbaren PCV2-spezifischen-Genomfragmenten in den Oral Fluid Proben (NIELSEN et al., 2018). Allerdings ist über eine Diagnostik mittels OF's nur die Betrachtung einer

Tiergruppe bzw. des gesamten Bestands möglich, ein Rückschluss auf Einzeltiere ist nicht möglich (NIELSEN et al., 2018). Für die Bestandsdiagnostik hingegen sind sie ein äußerst hilfreiches Mittel, um Aufschluss darüber zu geben, ob PCV2-spezifische-Genomfragmente ausgeschieden werden und somit im Bestand zirkulieren (HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017). In Beständen mit niedriger Prävalenz des Erregers innerhalb der Herde ist durch eine Kaustriekbeprobung die Gefahr des Übersehens von PCV2-positiven Tieren minimiert (NIELSEN et al., 2018).

### **3.3. Chancen aus der Nutzung von Oral Fluids**

Um nachhaltige Therapie- und Präventionsmaßnahmen in den Schweinebeständen entwickeln zu können, ist eine einfache und effektive Herdendiagnostik notwendig, in OF's können neben diversen Antikörpern und Virus-Nukleinsäuren auch verschiedenste Biomarker Aufschluss über die Herdengesundheit geben (RAMIREZ et al., 2012). Die Etablierung der Diagnostik durch Oral Fluids kann auch für diverse Erradikationsprogramme genutzt werden und somit einen Baustein für die Gesunderhaltung der Schweinepopulation legen (PRICKETT & ZIMMERMAN, 2010). Die Beprobung durch Oral Fluids bedarf nur geringer Anforderungen an Labor- und Infrastruktur, es ergibt sich hieraus auch die Möglichkeit, eher strukturschwache Regionen diagnostisch aufzuarbeiten (VAN CUONG et al., 2014). Oral Fluids können eine überaus hilfreiche Probe sein, um einen Einblick in die Herdengesundheit eines Schweinebestand zu bekommen (PRICKETT & ZIMMERMAN, 2010). Allerdings ist auch weiterhin die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse eine diagnostische Herausforderung (RAMIREZ et al., 2012).

In Bezug auf den Tierschutz und das Wohlbefinden der Tiere ist das Sammeln von Oral Fluids als absolut tierfreundliche und nicht invasive Methode zur diagnostischen Probennahme zu charakterisieren (PRICKETT & ZIMMERMAN, 2010).



### **III. MATERIAL UND METHODEN**

#### **1. Ziel dieser Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist es, die Prävalenz der in Deutschland als am relevantesten geltenden PCV2-Genotypen PCV2a, PCV2b und PCV2d in deutschen Schweinemastbeständen zu bestimmen. Die Auswahl der Bestände erfolgte basierend auf der Bestandsdichte in den jeweiligen Bundesländern zufällig. Das Alter der in die Studie eingeschlossenen Tiergruppen lag bei ca. 18 Wochen. Pro Bestand werden mindestens 200 Tiere mittels Oral Fluid Samples beprobt.

Es sollen folgende Arbeitshypothesen überprüft werden:

1. Basierend auf der aktuellen Literatur wird erwartet, dass PCV2d am häufigsten nachgewiesen wird.
2. Da eine zufällige Auswahl der Bestände erfolgt, wird erwartet, dass die Nachweisrate von PCV2d jedoch niedriger ausfällt als in der internationalen Literatur, da in den meisten Publikationen „klinische“ Proben ausgewertet werden.

## **2. Auswahl der Betriebe**

Insgesamt wurden 86 Betriebe beprobt, einziges Auswahlkriterium war eine Mindestzahl von 200 Tieren in der Altersgruppe (18. Lebenswoche).

### **2.1. Statistisches Gutachten des Stichprobenumfangs**

Die Berechnung des notwendigen Stichprobenumfangs erfolgte mit dem Programm BIAS für Windows 11.01 (Epsilon-Verlag, Frankfurt). Für die Prävalenzschätzung der einzelnen PCV2 Genotypen über die Schweinemastbetriebe wurde angenommen, dass die Prävalenz eines Genotyps in Deutschland 30% nicht übersteigt. Als Schätzgenauigkeit wurde eine Breite des 95% Konfidenzintervalls von 20 Prozentpunkten gewählt. Damit kommt man auf mindestens 80 Betriebe.

Die Verteilung über die Bundesländer sollte entsprechend der Anteile in den 12 Bundesländern erfolgen (Tabelle 2). In sechs Bundesländern liegt der Anteil an Betrieben unter 1%. Für diese Bundesländer wurde jeweils ein Betrieb für die Beprobung ausgewählt. Um über die übrigen Bundesländer einen entsprechend ungefähr passenden anteiligen Stichprobenumfang zuteilen zu können, wurde die insgesamt zu beprobende Betriebszahl auf 86 erhöht.

Pro Betrieb sollten mindestens 10 Untergruppen beprobt werden. Dieser Stichprobenumfang geht von der Annahme aus, dass in einem PCV2 infizierten Betrieb in mindestens 25% der Mastgruppen virämische Tiere vorhanden sind. Nach den Regeln der Binomialverteilung ist bei 10 Mastgruppen (=10 Kastricke) mit einer Wahrscheinlichkeit von über 95 % mindestens ein Kastrick PCV2-positiv. Die Gruppengröße von 20 Tieren pro Kastrick soll gewährleisten, dass eine von PCV2 betroffene Gruppe mit über 99%iger Sicherheit auch als solche erkannt wird.

Dies beruht auf folgenden Annahmen:

1. Innerhalb von 30 Minuten werden mindestens 80 % der Tiere (16 Tiere) den Kaustrick nutzen.
2. Es kann davon ausgegangen werden, dass in einer mit PCV2 infizierten Mastschweingruppe mindestens 20 % der Tiere virämisch sind und damit auch PCV2 über den Speichel auf den Kaustrick übertragen.

Damit wird nach den Regeln der Binomialverteilung mit einer Sicherheit von 99,6 % in einer infizierten Gruppe mindestens ein Tier positiven Speichel auf den Kaustrick übertragen.

## **2.2. Two stage cluster sampling**

Nach Informationen des Statistischen Bundesamtes, veröffentlicht im Rahmen der Publikation: „Viehbestand und tierische Erzeugung - Fachserie 3 Reihe 4“ gab es zum Startpunkt der Studie circa 23.200 Schweinemastbetriebe in Deutschland (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2017). Zur Berechnung der Anzahl an Beständen, die für das jeweilige Bundesland ausgewählt wurden, wurde die Anzahl der Mastbestände in den Bundesländern ins Verhältnis zu der Gesamtzahl der im Rahmen dieser Studie erfassten Mastbestände gesetzt. Diese Berechnung der Verteilung der Studienbestände und auch die Datengrundlage der erfassten Bestände in Deutschland ist in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: Aufstellung der Anzahl der Mastbestände deutschlandweit mit prozentualer Verteilung an der Studienpopulation (n=86) innerhalb der Bundesländer**

Bundesland	Anzahl erfasster Bestände (n)	Anteil der Bestände des Bundesland an Gesamtzahl	Anzahl ausgewählter Bestände je Bundesland
Baden-Württemberg	2200	9,5%	8
Bayern	4900	21,1%	18
Brandenburg	200	0,9%	1
Hessen	900	3,9%	3
Mecklenburg-Vorpommern	200	0,9%	1
Niedersachsen	5900	25,4%	22
NRW	7100	30,6%	26
Rheinland-Pfalz	300	1,3%	1
Sachsen	200	0,9%	1
Sachsen-Anhalt	200	0,9%	1
Schleswig-Holstein	900	3,9%	3
Thüringen	200	0,9%	1
gesamt	23200	100,0%	86

### **2.3. Kontaktaufnahme**

Um eine möglichst umfassende und unvoreingenommene Aufstellung von deutschen Schweinemastbeständen zu generieren, wurden Erzeugergemeinschaften und andere Organisationen kontaktiert. Diese Unternehmen unterhalten Kontakt zu vielen Betriebsleitern und sind zum Teil über das gesamte Bundesgebiet verteilt. Die Anfrage über die bestandsbetreuenden Tierärztinnen und Tierärzte war keine Option, um eine mögliche Vorselektion von „Problembeständen“ zu verhindern. Auch die angefragten Organisationen wurden nicht über das Studienziel informiert. Es erfolgte nur eine Erläuterung, dass es sich um eine Beprobung mittels Kaustrieken handelt.

Insgesamt wurden 99 Erzeugergemeinschaften, Beratungsringe und andere Unternehmen, welche im vor- oder nachgelagerten Sektor der Bestände tätig sind, angefragt. Sämtliche Kontaktdaten stammen aus der Liste QS-zugelassener Bündler (QS QUALITÄT UND SICHERHEIT GMBH, 2016). Letztendlich erklärten sich 28 Bündler bereit, die Untersuchung zu unterstützen und stellten den Kontakt zu den jeweiligen Betriebsleitern her. Teils übernahmen auch Erzeugergemeinschaften direkt die Verteilung der Probenmaterialien oder beprobten die Bestände selbst, da der Kontakt zu den Betriebsleitern aus datenschutztechnischen Gründen nicht möglich oder nicht erwünscht war.

### **2.4. Auswahl der Betriebe**

Insgesamt konnten 1809 mögliche Bestände aus allen Bundesländern zusammengetragen werden. Die Bestände wurden anonymisiert zusammengestellt, jedem Bestand wurde innerhalb der Bundesländer eine fortlaufende Nummer zugeteilt. Die Auswahl der Bestände erfolgte über den Online-Zufallsgenerator von [www.randomizer.org](http://www.randomizer.org) (URBANIAK, 2013). In Abbildung 1 ist für jedes Bundesland jeweils die Anzahl der auszuwählenden Bestände an der möglichen Anzahl der Bestände, die für eine Beprobung zur Verfügung standen, dargestellt. Für den Fall, dass ein Betriebsleiter kein Interesse an der Teilnahme hat oder aus anderen Gründen eine Teilnahme nicht möglich war, erfolgte eine Nachlosung ohne die bereits ausgewählten Bestände.



**Abbildung 1: Verteilung Betriebsauswahl innerhalb der Bundesländer; Anzahl der untersuchten Bestände pro Bundesland im Verhältnis zur möglichen Anzahl an Beständen (von den Erzeugergemeinschaften übermittelt)**

**Quelle:**

[https://de.m.wikipedia.org/wiki/Datei:Deutschlandkarte\\_\(Bunt\).svg](https://de.m.wikipedia.org/wiki/Datei:Deutschlandkarte_(Bunt).svg)

### 3. Beprobung

Im ersten Schritt wurden die Betriebsleiter über das Vorgehen der Untersuchung in Kenntnis gesetzt, das Studienziel erläutert und erste Managementdaten erfasst sowie Produktionsrhythmen des Bestands abgefragt. In dieser Vorabanfrage wurde die Aufstellungsform und vor allem die Buchtenzusammenstellung der Tiere in der 18. Lebenswoche eruiert. Zusätzlich wurden die weiteren Abläufe erklärt, und vor allem geklärt, wann eine passende Tiergruppe das entsprechende Alter erreicht hat.

Es sollten Mastschweine in der 18. Lebenswoche beprobt werden, ein Beprobungsplan für die Befestigung der Kaustricke und der weiteren Probenbearbeitung wurde beigelegt (dieser ist im Anhang dieser Arbeit beigelegt). Ein Strick sollte so angebracht werden, dass maximal 20 Schweine pro Strick Zugang haben. Sofern in einer Bucht mehr Tiere aufgestellt waren, wurden dementsprechend mehr Stricke pro Bucht verwendet. Die Anzahl der zu beprobenden Buchten wurde so gewählt, dass pro Bestand mindestens 200 Tiere an der Sammlung der OF's beteiligt waren.

Für die Beprobung wurden „Oral Fluid Sample Collection Accessory Kit“ von IDEXX (IDEXX, Scorpius 60 Building F Hoofddorp, 2132 LR, Niederlande) verwendet. Dieses beinhaltet jeweils fünf Kaustricke, Probengefäße mit Auffangbehältnissen und Kabelbindern, zusätzlich sind Einweghandschuhe und eine bebilderte Erklärung beigelegt. Die bereits vorbeschrifteten Probenröhrchen wurden auf den jeweiligen Bestand abgezählt mit Kabelbindern und Auffangtüten zur Verfügung gestellt. Für den Rückversand lag eine doppelte, saugende Umverpackung und eine vorfrankierte Rücksendebox (Süsse-Labortechnik, Kasseler Straße 76, 34281 Gudensberg, Hessen, Deutschland) bei.

Einzelne Beprobungen fanden auch durch die Mitarbeiter der Klinik für Schweine statt. Manche Erzeugergemeinschaften oder auch nachkontaktierte bestandsbetreuende Tierärztinnen und Tierärzte beteiligten sich direkt bei der Beprobung für diese Studie. Der Großteil der Bestände wurde allerdings durch die Landwirte selbst beprobt.

Die Kaustricke sollten durch die mitgelieferten Kabelbinder möglichst mittig in der Bucht befestigt werden. Allen Schweinen der Beprobungsgruppe sollte so der Zugriff auf den Strick ermöglicht werden. Optimalerweise sollte der Strick freihängend auf Schulterhöhe der Schweine befestigt sein. Eine stabile Befestigung der Kaustricks ist für die Beprobung der Schweine in der 18. Lebenswoche unbedingt notwendig. Die Kaustricke verblieben für 25 bis 30 Minuten hängend in der Bucht. Das Auswringen der Stricke erfolgte direkt in die mitgelieferten Beutel, an welchem das Probengefäß mittels Gummiband befestigt war. Bis zum Versand sollen die Proben gekühlt gelagert werden. Der Versand soll am Anfang der Woche in Auftrag gegeben werden, um Verzögerungen beim Postweg zu vermeiden. Zum Erhalt der Lagerbedingungen während des Transportwegs wurde ein mitgeliefertes Kühlpack gefroren mitversandt. Zur Erläuterung dieser Beprobung und um über den Umgang mit dem Probenmaterial aufzuklären, wurden ein bebildeter Beprobungsplan jeder Sendung beigelegt, dieser Vordruck ist im Anhang der Arbeit angefügt.

#### **4. Labordiagnostik**

Die Proben kamen über den Zeitraum von acht Monaten verteilt in der Klinik für Schweine der LMU München in Oberschleißheim an. Die Proben wurden direkt nach Anlieferung bei 1300g für zehn Minuten zentrifugiert (Rotanta 460R Zentrifuge, Andreas Hettich® GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland). Anschließend wurde der Überstand der Proben in je bis zu drei Aliquots a 1ml pipettiert, zusätzlich wurden aus den Kaustrickproben eines Bestands Pools gebildet. Ein Pool besteht aus 3-6 Einzelproben, die Zusammenstellung erfolgte je nach Anzahl der zurückgesandten Proben.

Die Lagerung erfolgte bei -20°C in der Klinik für Schweine. Die Bearbeitung der Proben erfolgte am Lehrstuhl für Virologie, Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen der Tierärztlichen Fakultät der LMU München. Zur ersten Kategorisierung der Bestände wurden mittels PCR nach ZHAO et al. (2010) modifiziert nach EDDICKS et al. (2016) (siehe Kapitel 4.2.) gescreent auf das Vorkommen von PCV2.



Im Anschluss erfolgte der Nachweis der Genotypen mittels einer neuartigen *inhouse* qPCR und zusätzlich die Sequenzierung der Produkte aus der PCR-Untersuchung GAGNON et al. (2007) mit phylogenetischer Einordnung der Nukleotidsequenzen.

#### **4.1.      Aufreinigung der DNA**

Zur Aufreinigung der DNA wurde das kommerziell erhältliche NucleoSpin® 8 Virus Core Kit- vacuum processing (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Neumann-Neander-Str. 6-8, 52355 Düren, Deutschland) verwendet. Die Extraktion der DNA erfolgte nach Herstellerangaben. Den Pipettierprozess führte der Roboter Microlab® STARLet (Hamilton Life Science Robotics GmbH, Fraunhoferstr. 17, 82152 Martinsried, Deutschland) durch. Hierfür wurden 100µl der Proben in 400µl Lysis Puffer RAV1 und 20µl Proteinase K zusammen 10 Minuten auf der Heizplatte bei 70°C inkubiert. Dem Gemisch wurden daraufhin 400µl Ethanol 96% zugesetzt, nach gründlicher Vermischung wurde es in die NucleoSpin® Virus Binding Strips pipettiert. Mittels angelegtem Vakuum von -0,2 bar wurden die freien DNA-Fragmente an die Silikatmembran der NucleoSpin® Virus Binding Strips gebunden. Daraufhin folgten drei Waschschriffe mit verschiedenen Puffern (RAW und RAV3). Die Elution der gebundenen DNA erfolgte mittels des auf 70°C erwärmten Elutionspuffers. Dieser wurde zur Probe gegeben und eine Minute gemeinsam mit ihr inkubiert. Die eluierte DNA wurde über das Vakuumsystem von der Silikatmembran gelöst und in die vorbereiteten Probenröhrchen gefüllt.

#### **4.2.      Pan-PCV2-qPCR**

Zunächst wurden die 244 Pools mittels real-time-PCR auf Vorkommen von PCV2-DNA untersucht, wobei das erprobte Vorgehen der PCR nach ZHAO et al. (2010) modifiziert nach EDDICKS et al. (2016) angewandt wurde (Primer vorwärts 5'-CGG ATA TTG TAK TCC TGG TCG TA, Primer rückwärts modifiziert1 5'-CCT GTY CTW GAT TCC ACT ATT GAT T, Primer rückwärts modifiziert2 5'-CCT GTC CTW GAT AGG ACA ATC GAT T, Sonde modifiziert Fam-CGA GGC CTA CRT GGT CYA CAT TTC-BHQ1).

Es wurde das QuantiTect Sonden-Mix PCR-kit (Quiagen, Hilden, Germany) verwendet. Je 5µl der Proben wurden mit 12,5µl PCR Mastermix, 5,5µl RNase-freiem Wasser und 2,0µl Primer-Sonden-Mix MOD PCV2 vermischt. Die PCR wurde mit dem AriaMx Real-time PCR System G8830A-MY19295256 (Agilent Technologies, Santa Clara CA, United States) durchgeführt. Gemäß Protokoll erfolgte eine 15 Minuten lange Polymerase-Aktivierung bei 94°C, anschließend folgten 42 Zyklen, bestehend aus einer 15 Sekunden langen Denaturierung bei 94°C und einer 60 Sekunden langen Annealing bzw. Extensionsphase bei 60°C. Jedem Durchlauf wurde sowohl eine Negativkontrolle (NTC) als auch eine Positivkontrolle zur Überprüfung der Reaktion beigelegt. Die Ergebnisse wurden mittels Ct-Werten erfasst, ein Ct-Wert unter 35 wurde als positiv gewertet, ein Ct-Wert zwischen 35 und 40 als schwach/fraglich positiv gewertet, alle Werte über 40 als negativ betrachtet.

Im Anschluss an die Untersuchung der Pools wurden alle Einzelproben, welche in den positiven Pools zusammengefasst waren, in gleicher Weise untersucht.

#### **4.3. PCV2-Genotyp-spezifische qPCR**

PCV2 positive Poolproben wurden mittels einer *inhouse*-Methode des Instituts für Infektionsmedizin und Zoonosen, Lehrstuhl für Virologie (Labor Dr. Fux) hinsichtlich ihrer Zuordnung zu den jeweiligen Genotypen analysiert. Hierfür wurde die bereits eluierte DNA, welche bis zu dieser Untersuchung tiefgefroren bei -20°C gelagert war, verwendet. Zu 4µl jeder der Proben wurden pro Ansatz 10µl Luna Universal Mastermix, 4,4µl RNase-freies Wasser und 1,6µl Primer-Sonden-Mix spezifisch für Genotyp PCV2a, PCV2b oder PCV2d. Die Polymerase-Aktivierung erfolgte durch Erhitzen des Gemischs auf 95°C über eine Minute, anschließend folgten 42 Zyklen, welche sich aus Denaturierung (95°C für 15 Sekunden), Annealing (59°C für 20 Sekunden) und Extension (68°C für 20 Sekunden) zusammensetzten. Auch diese Methode wurde pro Durchgang durch eine Negativ- und eine Positivkontrolle überprüft. Hierbei wurde jeder Genotyp-Ansatz auch mit den Positivkontrollen der beiden anderen Genotypen auf eine mögliche

Kreuzreaktion untersucht. Mithilfe dieser Untersuchung war innerhalb der PCV2-positiven Bestände der Nachweis der Genotypen PCV2a, PCV2b und PCV2d möglich.

#### 4.4. Amplifikation und Sequenzierung

Pro Bestand wurde eine PCV2-positive Probe ausgewählt, um eine Vollgenomsequenzierung durchzuführen. Da die Quantität des Virus in der Probe mit der Qualität der Sequenzierungsergebnisse korreliert, wurde eine sequenzunabhängige Voranreicherung zirkulärer DNA mittels rolling-circle-amplification (RCA) durchgeführt. Hierzu wurde das TempliPhi™ 100 Amplification Kit von GE-Healthcare verwendet. 1µl der aufgereinigten DNA wurde mit 5µl *sample buffer* drei Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden, nach der Abkühlung der Proben, der vorbereitete Enzym-Mix (0,2µl) und der *reaction buffer* (5µl) zugegeben. Über Nacht wurde dieser Ansatz bei 30°C inkubiert. Zum Beenden der Reaktion wurde dann das Gemisch für zehn Minuten auf 65°C erhitzt. Zur Überprüfung der Amplifikation wurde eine qPCR nach EDDICKS et al. (2016) angeschlossen.

Das Gesamtgenom wurde durch zwei sich überlappende PCR-Fragmente nach GAGNON et al. (2007) (Tabelle 3) amplifiziert, dafür wurde der ReadyMix Taq PCR Reaction Mix (Sigma Aldrich) verwendet. Die erwarteten Fragmente haben eine Länge von 1255bp- und 1044bp.

**Tabelle 3: Primer der PCR nach GAGNON et al. (2007)**

Primer	Sequenz
PCV2-A for	5' - GGA CCC CAA CCC CAT AAA A - 3'
PCV2-A rev	5' - CCC TCA CCT ATG ACC CCT ATG T - 3'
PCV2-B for	5' - TGT TTT CGA ACG CAG TGC C - 3'
PCV2-B rev	5' - CCG TTG TCC CTG AGA TCT AGG A - 3'

Gemäß Protokoll wurden zu 5µl der Proben je 25µl Ready mix, 18µl RNase-freies Wasser und 2µl Primer-Mix gegeben. Das Temperaturprotokoll war gekennzeichnet von einer dreiminütigen Polymeraseaktivierung bei 95°C, gefolgt von 35 Zyklen mit je 30 Sekunden Denaturierung bei 95°C, einer Minute Annealing bei 52°C und zwei Minuten Extension bei 72°C. Die PCR Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert und im Anschluss mittels Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systems (Promega Corporation, 2800 Madison, USA) aufgereinigt. Dieser Prozess wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Auftragssequenzierung wurden die spezifischen Genomfragmente mit entsprechender Fragmetlänge an Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) versandt. Erhaltene Teilsequenzen wurden im Anschluss mithilfe der Lasergene®-Software der Firma DNASTAR zu Vollsequenzen zusammengefügt (DNASTAR, Inc., Madison, USA). Zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums wurde die Software „Mega 7“ (Center for Evolutionary Medicine and Informatics, The Biodesign Institute, Tempe, USA) verwendet.

#### 4.5. Probenauswahl für die jeweiligen PCR-Untersuchungen

Eine PCR- Untersuchung wurde als positiv gewertet sofern der ermittelte Ct-Wert < 40 war.

Im nachfolgendem Entscheidungsbaum (Abbildung 2) ist das labordiagnostische Vorgehen und die Auswahl der Proben für die jeweilige PCR-Untersuchung visualisiert.

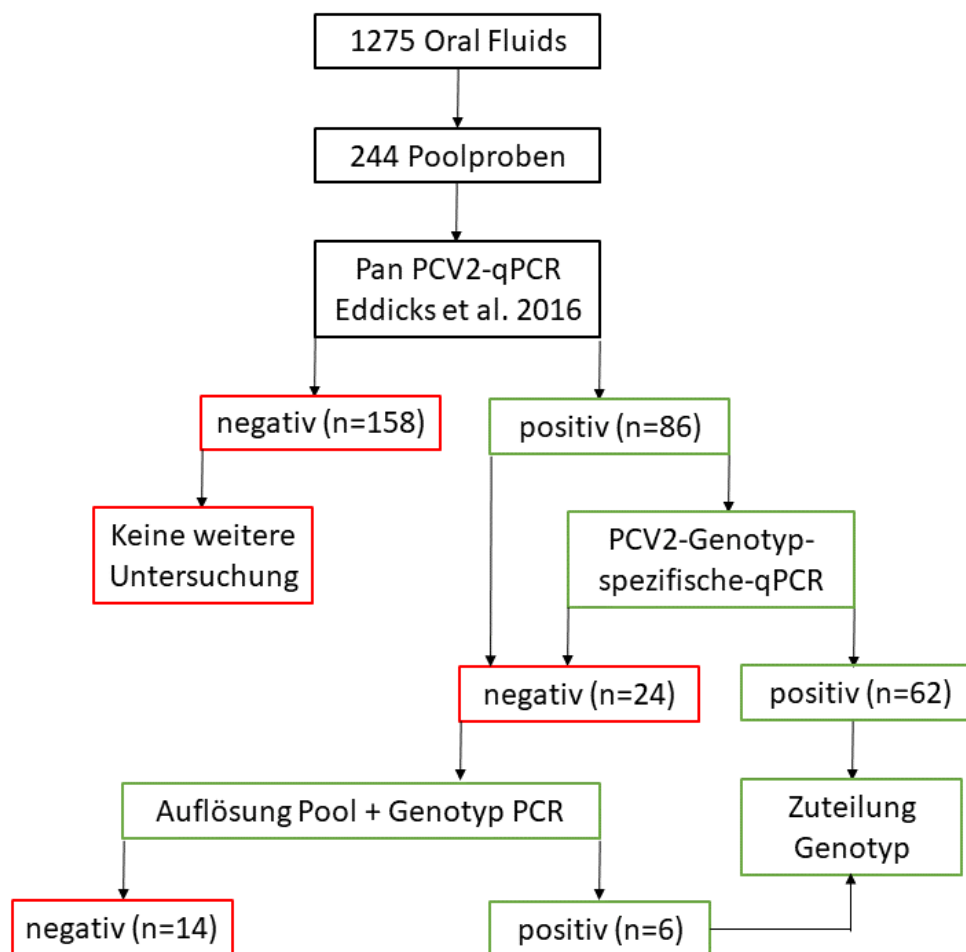


Abbildung 2: Aufgliederung der Vorgehensweise der molekularbiologischen Untersuchungen

Insgesamt wurden im ersten Schritt 244 Poolproben mittels beschriebener Pan-PCV2-qPCR untersucht. In diesem Schritt konnte in 86 Pools PCV2-DNA nachgewiesen werden, zur Verifizierung dieses Screenings wurden nachfolgend die Einzelproben, die in diese positiven Pools miteingeflossen sind, einzeln mittels Pan-PCV2-qPCR untersucht. In den 86 positiven Pools waren 468 Oral Fluids zusammengefasst, die in diese Nachuntersuchung mitaufgenommen wurden.

Für die PCV2-Genotyp-spezifische qPCR wurden Proben aus Beständen ausgewählt, die sowohl in ersten Screening als auch in der Nachuntersuchung positiv waren. Es handelte sich dabei vor allem um Poolproben, sofern hier kein Genotyp nachgewiesen werden konnte, wurden auch hier Oral Fluids einzeln nachuntersucht. So ergibt sich eine Gesamtprobenzahl für die PCV2-Genotyp-spezifische qPCR von 106.

Ein Bestand wurde schlussendlich als positiv gewertet, sofern die untersuchten Oral Fluids oder die daraus gebildeten Poolproben sowohl bei der PAN-PCV2-qPCR wie auch der Genotyp-spezifischen qPCR ein positives Ergebnis lieferten.

## 5. Fragebogen

Zusammen mit den Beprobungsmaterialien wurde den Landwirten mit der Bitte um vollständige Beantwortung ein Fragebogen übersandt.

Hierbei wurden die Postleitzahl der Bestände, die bestandsbetreuende Tierärztin oder der bestandsbetreuende Tierarzt und die Betriebsform erhoben. Des Weiteren wurden die durchgeführten Impfmaßnahmen abgefragt. Einerseits ging es dabei um die Vakzination der beprobten Tiere, andererseits auch um die Impfungen der Muttertierherden. Hierbei standen verschiedene Impfstoffe auf dem Vordruck zur Auswahl und es war Platz für Ergänzungen vorgesehen. Außerdem wurden die baulichen Gegebenheiten der Bestände abgefragt, wie zum Beispiel das Vorhandensein einer Krankenbucht und das Lüftungssystem. Auch der Belege-Rhythmus der verschiedenen Abteile wurde berücksichtigt. Zusätzlich wurde abgefragt, wie der Umgang mit erkrankten Einzeltieren ist, inwieweit diese umgestallt oder einer neuen Gruppe zugeordnet werden. Zur besseren Charakterisierung der Betriebe wurde auch erfragt, aus wie vielen Herkunftsorten in diesem Bestand Tiere zugekauft wurden und woher die Landwirte die Ferkel beziehen. Auch die üblichen Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen sowie Schädlingsbekämpfungsstrategien wurden erfasst. Die Ferkelverluste über den Mastzeitraum, Auffälligkeiten am Schlachthof und die Kennzahl zur Therapiehäufigkeit konnten in einem Textfeld frei eingetragen werden. Der Tiergesundheitsindex, welcher von Schlachthöfen erhoben, durch die QS Qualität und Sicherheit GmbH zusammengefasst und an die Landwirte weitergegeben wird, wurde in den Bereichen Atemwegsgesundheit (Herz, Lunge und Brustfell), Organengesundheit (Leber, Darm), Gliedmaßen-Gesundheit (Gelenke, Liegebeulen) sowie Unversehrtheit der Schlachtkörper (Haut, Ohren, Schwanz, Treibespuren) abgefragt.

Dieser Fragebogen ist in der Form, wie den Landwirten zugesandt, im Anhang zu finden.

## 6. Definition unabhängiger und abhängiger Variablen

Im Folgenden werden die unabhängigen und abhängigen Variablen definiert. Diese Variablen ergeben sich aus den abgefragten Faktoren des Fragebogens. Im Weiteren werden mögliche statistisch signifikante Zusammenhänge der Variablen sowohl mit dem Nachweis von PCV2 an sich als auch mit dem Nachweis der Genotypen PCV2a, PCV2b und PCV2d untersucht.

### 6.1. Nominale Variablen

#### 6.1.1. Unabhängige Variablen

Als unabhängige nominale Variable auf den Einfluss des Nachweises von PCV2 wurde die „Betriebsform“ (nur Mast oder geschlossener Bestand), betrachtet. Als Ferkelimpfungen: Das porcine reproduktive und respiratorische-Syndrom Virus (PRRSV), porcine Circoviren Typ 2 (PCV2), *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo), *Escherichia coli* (E. coli), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) und *Glässerella parasuis* (Glässer). Des Weiteren wurden auch Impfungen der Muttersauen in Betracht gezogen. Hier wurde jeweils das porcine reproduktive und respiratorische Syndrom Virus (PRRSV), die porcinen Circoviren Typ 2 (PCV2), *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo), *Escherichia coli* (E. coli), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) und *Glässerella parasuis* (Glässer) wie auch das porcine Parvovirus (PPV) in Kombination mit *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Parvo/Rotlauf), Influenza, Rhinitis atrophicans und Salmonellen überprüft.



Als weitere nominale Variablen bei den Betriebsdaten sind definiert: „kontinuierlich belegt“, „Rein-Raus-System“ ob „stallweise“, „abteilweise“ oder „buchtenweise“, das Vorhandensein einer Krankenhucht („Krankenhucht zur Separation“, „keine Krankenhucht zur Separation“), möglicher Kontakt davon zur restlichen Tiergruppe („Krankenhucht mit Kontakt zur restlichen Tiergruppe“, „abgeschottete Krankenhucht“), Reintegration klinisch auffälliger Tiere („Reintegration Kranker zur Gruppe“, „keine Reintegration separierter Tiere“), Verbleib schlechter wachsender Tiere in der Gruppe („Kümmerer bleiben bei Gruppe“, „Kümmerer werden separiert“) und Zurückstallung schlechter wachsender Tiere zu einer jüngeren Tiergruppe („Kümmerer werden zu Jüngeren gestallt“, „kein Zurückstallen“).

Alle nominalen Faktoren wurden nicht nur auf den Nachweis von PCV2 untersucht, sondern auch auf Assoziationen zwischen den Variablen und dem Nachweis der Genotypen PCV2a, PCV2b und PCV2d.

### **6.1.2. Abhängige Variablen**

Als abhängige Variable wird einerseits der Nachweis von PCV2 in die Berechnung mitaufgenommen, andererseits der Nachweis der Genotypen PCV2a, PCV2b oder PCV2d berücksichtigt.

## **6.2. Ordinale Variablen**

### **6.2.1. Unabhängige Variablen**

Als unabhängige ordinale Variable auf den Einfluss des Nachweises von PCV2 wurde die Zeit, die der Stall bis zur Wiederbelegung leer steht, in Tagen ausgewertet. Bei Kategorie I ist die Leerstandzeit weniger als sieben Tage, bei Kategorie II 7 bis 14 Tage, bei Kategorie III mehr als 14 Tage. Zusätzlich wird die Ferkelherkunft betrachtet: „eine Herkunft“, „zwei Herkünfte“, „drei Herkünfte“ oder „vier oder mehr Herkünfte“ wie auch das Herkunftsland (Deutschland, Niederlande oder Dänemark).

### **6.2.2. Abhängige Variablen**

Abhängige ordinale Variablen, welche auf einen möglichen Einfluss auf die Nachweisrate von PCV2 und den jeweiligen Genotypen hin untersucht wurden, sind die Kategorien der Ferkelverluste und der Kennzahl der Therapiehäufigkeit. Die Kategorien anhand der Ferkelverluste sind wie folgt definiert: Kategorie I entspricht Ferkelverlusten von  $\leq 1\%$ , Kategorie II entspricht  $> 1\%$  und  $\leq 2\%$ , Kategorie III entspricht  $> 2\%$  und  $\leq 3\%$  und zu Kategorie IV zählen Bestände mit  $> 3\%$  Ferkelverlusten über die gesamte Mastdauer. Die Kategorien der Kennzahl der Therapiehäufigkeit sind: Kategorie I mit Werten  $< 2$ , Kategorie II entspricht 2-4, zu Kategorie III zählen Bestände mit einer Therapiehäufigkeit  $< 4$ .

### **6.3. Metrische Variablen**

Als metrische Daten wurden die Ferkelverluste (in %) wie auch die Kennzahl zur Therapiehäufigkeit (in Tagen) verwendet. Die Tiergesundheitsindices wurden als weitere „Gesundheitsindikatoren“ betrachtet, darunter der Atemwegsscore (in %), der Organscore (in %) wie auch der Gliedmaßenscore (in %) und die Unversehrtheit (in %). Dieser ermittelte Prozentsatz gibt den Anteil der unauffälligen Tiere dieser Kategorie an. Diese fließen als abhängige Variablen auf die Nachweisrate von PCV2 und der jeweiligen Genotypen hin in die Berechnung mit ein.

## 7. Statistische Auswertung

Die statistische Datenauswertung erfolgte durch die Programme IBM SPSS Statistics® (Version 26.0. IBM® SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und Microsoft Excel® (2016, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). Für die qualitative Auswertung wurden die Betriebe als statistische Einheit angesehen.

Das Signifikanzniveau der Untersuchung lag bei 5% ( $p=0,05$ ) bei einem Konfidenzintervall von 95%.

Die deskriptive Auswertung der Daten erfolgte mittels Kreuztabellen, mögliche Zusammenhänge der Variablen wurden mittels Cui-Quadrat-Test nach Pearson überprüft. Waren mehrere unabhängige Variablen mit einer oder mehreren abhängigen Variablen assoziiert ( $p \leq 0,1$ ), wurde im Folgenden eine binär-logistische Regression durchgeführt.

Für die Untersuchung möglicher Assoziationen abhängiger metrischer Variablen mit den oben genannten unabhängigen nominalen Variablen wurde zuerst auf Normalverteilung getestet. Waren die Daten normalverteilt, wurde diese mittels t-Test berechnet. Für den Fall, dass sich die Daten nicht normalverteilt darstellten, wurden nicht-parametrische Tests durchgeführt (Mann-Whitney U-Test).

Zur Beurteilung der Normalverteilung der Daten wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet.

## IV. ERGEBNISSE

### 1. Deskriptive Beschreibung der Studienbestände

Die deskriptive Darstellung der Studienbestände basiert auf der Auswertung des Fragebogens (Anhang 2). Nicht für alle Parameter waren alle Fragebögen ausgefüllt. Die Datengrundlage der einzelnen Variablen ist somit verschieden. Die Anzahl der Bestände, die den Parameter beantwortet haben, ist bei jeweiligem Faktor angegeben.

#### 1.1. Betriebsform

Bei den ausgewählten Beständen handelte es sich zu 72,1% (62/86) um Mastbestände, 27,9% (24/86) der Bestände werden im geschlossenen System bewirtschaftet.

#### 1.2. Impfschemata

Tabelle 4 und Tabelle 5 zeigen den relativen Anteil der jeweiligen Impfungen der Ferkel und Sauen auf Bestandsebene.

**Tabelle 4: Anteile der Bestände mit Ferkelimpfungen gegen PRRSV, PCV2, *M. hyo* oder Kombinationen daraus an allen in dieser Kategorie auswertbaren Bestände der Studienpopulation (n=84)**

Nur PRRSV	8,3% (7/84)
Nur PCV2	10,7% (9/84)
Nur <i>M. hyo</i>	1,2% (1/84)
Kombination PRRSV-PCV2- <i>M. hyo</i>	48,8% (41/84)
Kombination PCV2- <i>M. hyo</i>	38,1% (32/84)

Als weitere Impfmaßnahmen wurde die Impfung gegen *E. coli* erfasst, welche in 10,7% (9/84) der Bestände durchgeführt wird. 7,1% (6/84) der Bestände impfen die untersuchten Tiere gegen APP, auch 7,1% (6/84) der Bestände impfen gegen *Lawsonia intracellularis*. Ein Bestand führt eine Impfung gegen *Glässerella parasuis* durch, dies entspricht 1,2% (1/84).

**Tabelle 5: Anteile der Bestände mit Sauenimpfungen gegen PRRSV, PCV2, M. hyo und Parvo/Rotlauf an allen in dieser Kategorie auswertbaren Bestände der Studienpopulation (n=56)**

PRRSV	78,6% (44/56)
PCV2	42,9% (24/56)
M. hyo	28,6% (16/56)
Parvo/Rotlauf	89,3% (50/56)

Weitere Sauenimpfungen der ausgewerteten Bestände sind die Immunisierung gegen Influenza, diese wird in 41,1% (23/56) der Bestände durchgeführt. In 28,6% (16/56) der Bestände werden die Muttersauen gegen *E. coli* geimpft, in 3,6% (2/56) gegen *Rhinitis atrophicans* und in 8,9% (5/56) der Bestände gegen APP. Des Weiteren geben 1,8% (1/56) der Bestände an die Muttersauen gegen Salmonellen zu impfen und 19,6% (11/56) der Bestände immunisieren die Sauen gegen *Glässerella parasuis*.

### 1.3. Bestandsmanagement

Im Folgenden werden die Faktoren des Bestandsmanagements der Auswertung des Fragebogens dargestellt (Tabelle 6). Zugunsten der Übersichtlichkeit wurden diese Daten nur als Tabelle dargestellt.

**Tabelle 6: Bestandsmanagement und der Stallbelegung der Bestände der Studienpopulation**

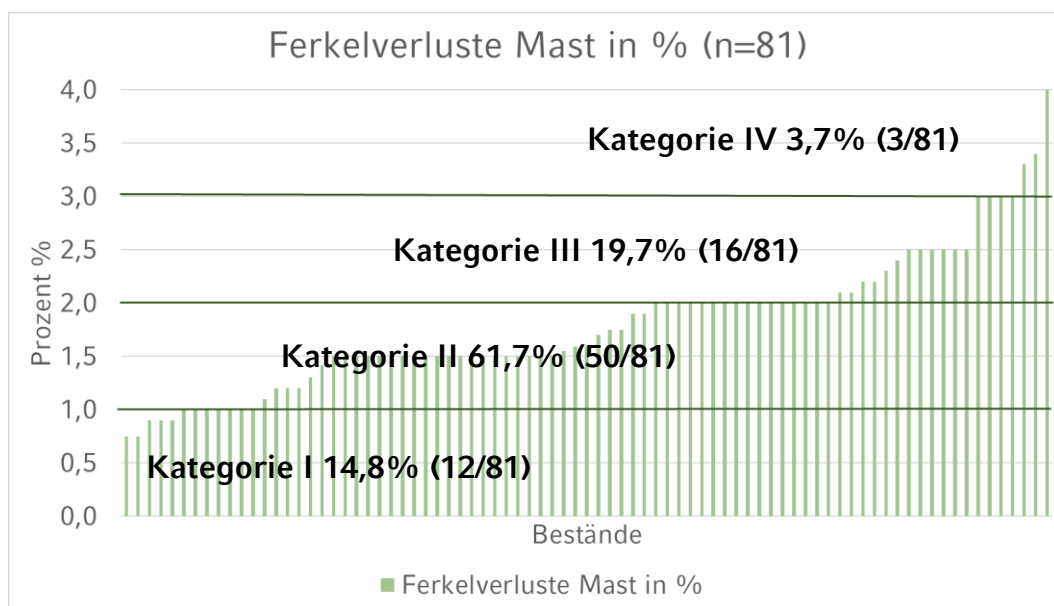
Kontinuierliche Belegung	14,1% (12/85)
Rein-Raus-Belegung	85,9% (73/85)
- stallweise	26,5% (18/68)
- abteilweise	70,6% (58/68)
- buchtenweise	2,9% (2/68)
Krankenbucht zur Separation	97,7% (84/86)
- abgeschottete Krankenbucht	65,5% (55/84)
- Krankenbucht mit Kontakt zur restlichen Tiergruppe	34,5% (29/84)
Reintegration separierter Tiere	16,7% (14/84)
Kümmerer bleiben bei Gruppe	71,6% (58/81)
Kümmerer werden zu Jüngeren gestallt	10,5% (6/57)
Leerstand	
- weniger als 7 Tage	34,9% (29/83)
- zwischen 7 & 14 Tagen	61,4% (51/83)
- mehr als 14 Tage	3,6% (3/83)

#### **1.4. Ferkelherkünfte**

Die Verteilung der Bestände hinsichtlich der Anzahl der Ferkelherkünfte zeigt, dass 88,4% (76/86) der Bestände ihre Tiere aus einer direkten 1:1-Anbindung beziehen. 9,3% (8/86) der Bestände stallen Tiere aus zwei Herkünften auf und 2,3% (2/86) der Bestände haben Tiere aus vier oder mehr Herkünften. Bezüglich der Region des Ferkelzukaufs zeigt sich, dass 93,0% (80/86) der Bestände ihre Tiere von deutschen Ferkelerzeugern beziehen. In jeweils 3,5% der Bestände stammen die beprobten Masttiere aus Dänemark (3/86) und den Niederlanden (3/86).

### 1.5. Ferkelverluste über die Dauer der Mast

Hinsichtlich der Ferkelverluste werden die Bestände, wie oben beschrieben, kategorisiert betrachtet. Die Einteilung der Bestände in Kategorie I, II, III und IV ist wie auch die angegebenen Ferkelverluste in % der jeweiligen Bestände aus Abbildung 3 ersichtlich. Zugunsten der Übersichtlichkeit wurde auf die Beschriftung der x-Achse verzichtet. Jeder Balken stellt einen Bestand dar, aufsteigend sortiert anhand der Ferkelverluste.

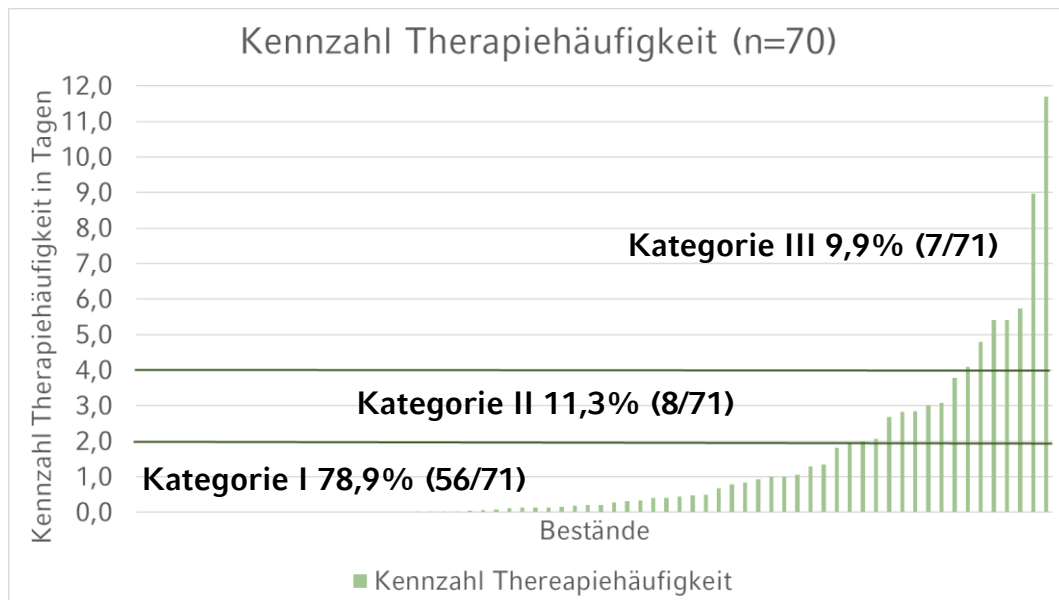


**Abbildung 3: Darstellung der Ferkelverluste aufsteigend sortiert in den Beständen mit Kategorisierung (I, II, III, IV) (n=81)**



### 1.6. Kennzahl der Therapiehäufigkeit

Die Bestände wurden auch nach der angegebenen Therapiekennzahl in beschriebene Kategorien I, II und III eingeordnet, diese Kategorisierung ist wie auch die angegebene Kennzahl der Therapiehäufigkeit der Bestände in Abbildung 4 dargestellt. Zu Kategorie I zählen auch die 29,6% (21/71) der Bestände, welche als Therapieindex 0,00 angegeben haben. Zugunsten der Übersichtlichkeit wurde auf die Beschriftung der x-Achse verzichtet. Jeder Balken stellt einen Bestand dar, aufsteigend sortiert anhand der Kennzahl der Therapiehäufigkeit.



**Abbildung 4: Darstellung der Kennzahl der Therapiehäufigkeit der Bestände aufsteigend sortiert mit Kategorisierung (I, II, III) (n=70)**

### 1.7. Tiergesundheitsindices

Im Folgenden sind die Tiergesundheitsindices der jeweiligen Bestände aufgeführt (Tabelle 7), bei Nennung von zwei oder mehr Werten wurde zur Berechnung des Tiergesundheitsindex der Mittelwert daraus gebildet.

**Tabelle 7: Tiergesundheitsindices nach QS der Bestände (n=56)**

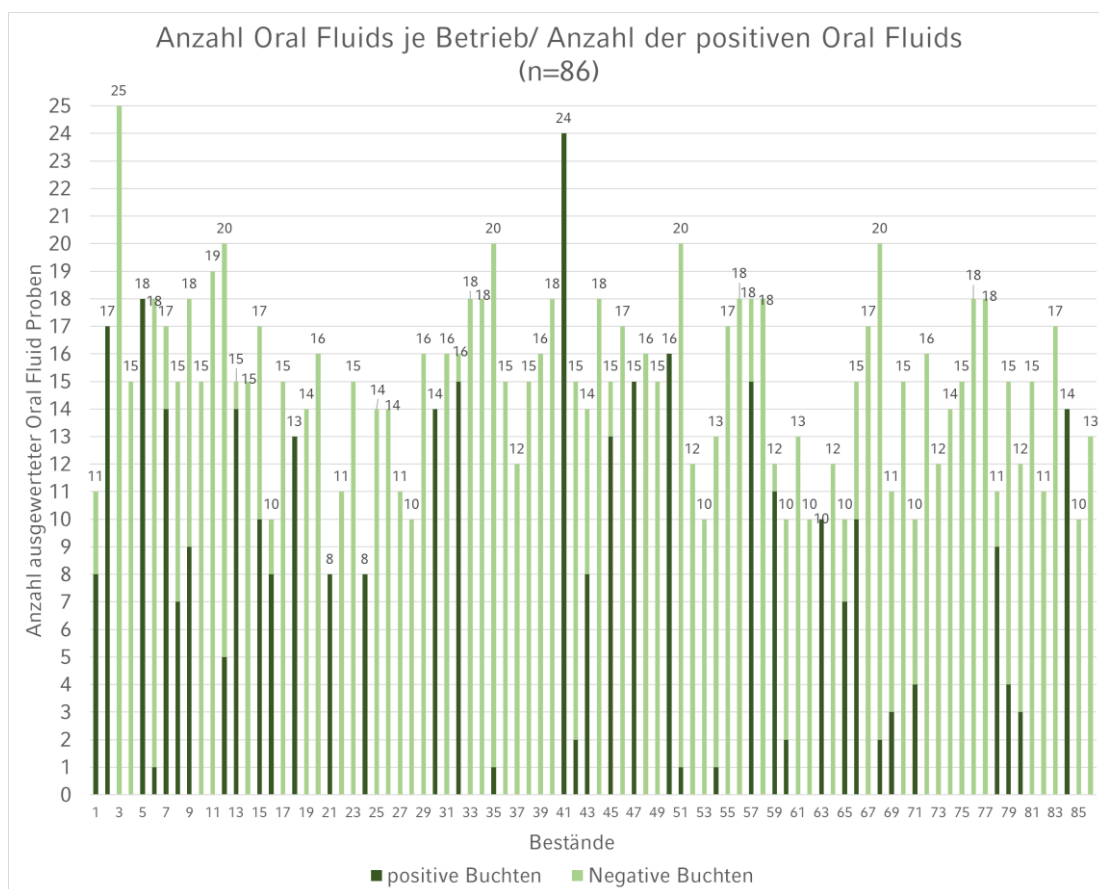
Bestand	Atemwegs- score	Organscore	Gliedmaßen- score	Unver- sehrtheit
	in %	in %	in %	in %
3	-	15	55	92
5	-	88	36	97
6	-	90	43	94
7	55	82	35	100
8	-	84	79	100
9	29	52	62	41
10	66	90	55	47
11	44	82	50	9
13	81	82	79	94
14	44	87	57	66
15	50	80	82	100
19	50	98	47	62
21	20	98	85	82
22	-	76	79	85
23	54	90	82	76
24	40	74	90	99
28	81	92	79	100
29	92	94	99	100
30	88	94	75	91
33	53	88	7	45
35	82	98	62	43
36	48	94	31	68
38	44	68	35	85
39	92	98	85	100

---

40	10	86	13	16
41	27	-	38	85
42	56	68	31	8
44	73	52	72	71
45	86	94	32	88
46	81	96	27	47
47	81	92	34	73
48	81	92	34	68
49	30	100	25	15
50	92	84	47	91
51	69	90	57	82
52	70	88	32	38
53	47	87	4	79
54	75	-	96	-
55	53	78	-	91
56	48	96	36	76
57	47	57	55	34
58	52	84	20	45
59	25	66	79	79
60	51	96	43	85
61	68	70	94	55
62	73	92	99	93
65	30,3	55,7	91	86
66	64	85	88	80
67	42,7	52,3	98,5	73
68	79,3	89,3	33,5	53,7
69	74	89	100	88
70	54	76	100	100
72	88	96	86	91
73	67	88	80	80
77	73	90	100	73
86	23	94	45	50

### 1.8. Anzahl der auswertbaren Oral Fluid Proben

Zur Auswertung lagen 1275 Oral Fluids vor. Im Mittel wurden pro Bestand 14,8 Oral Fluid Proben (min: 8; max: 25; Std.-Abweichung: 3,3) untersucht. Abbildung 5 zeigt die jeweilige Anzahl der in die Untersuchung miteinbezogenen Oral Fluid Proben der Bestände und gibt die Anzahl der positiven Stricke des Screenings an. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist in Abbildung 5 nur jeder zweite Bestand beschriftet, die Anordnung ist fortlaufend.



**Abbildung 5: Anzahl der untersuchten/ PCV2-positiven Oral Fluids pro Bestand (n=86)**

## **2. Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung der Oral Fluids auf PCV2-DNA**

Im Folgenden werden die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung der Oral Fluid Proben dargestellt. Insgesamt wurden 1275 Oral-Fluid-Proben aus 86 Beständen ausgewertet, aus denen 244 Pools erstellt wurden, die zu einem ersten Screening auf PCV2-DNA dienten.

### **2.1. Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung der Oral Fluid Poolproben auf PCV2-DNA**

Insgesamt waren 35,2% (86/244) der Poolproben PCV2-DNA-positiv. Diese stammen aus 47,7% (41/86) der Bestände. Die Oral Fluid Proben, die in die positiven Poolproben miteingeflossen sind, wurden nachfolgend nochmal einzeln auf PCV2-DNA untersucht. In dieser Untersuchung konnte in 73,5% (344/468) der untersuchten Einzelproben PCV2-DNA nachgewiesen werden.

### **2.2. Ergebnisse der Genotyp-spezifischen qPCR**

Mittels Genotyp-spezifischer qPCR war es möglich in 64,2% (68/106) der damit untersuchten Oral Fluids und Poolproben der Oral Fluids einen Genotyp von PCV2 nachzuweisen. Für die PCV2-Genotyp-spezifische qPCR wurden Proben aus Beständen ausgewählt, die sowohl in ersten Screening als auch in der Nachuntersuchung positiv waren. Die Gesamtprobenzahl für die PCV2-Genotyp-spezifische qPCR von 106 ergibt sich aus 86 untersuchten Poolproben und 20 Oral Fluids, die einzeln untersucht wurden. Die einzelne Untersuchung von Oral Fluids wurde durchgeführt, wenn in der PAN-PCV2-qPCR PCV2-DNA nachgewiesen worden ist, aber den Poolproben in der Genotyp-spezifischen PCR kein Genotyp zugeordnet werden konnte.

PCV2a konnte in 30,9% (21/68) in Genotypen einzuordnenden Oral Fluids nachgewiesen werden, 7,4% (5/68) waren positiv für PCV2b und 55,9% (38/68) positiv für PCV2d. In vier Oral Fluids bzw. Poolproben von Oral Fluids konnten zwei Genotypen nachgewiesen werden, einmal die Genotypen PCV2b und PCV2d (1,5%(1/68)), in drei Fällen PCV2a und PCV2d (4,4% (3/68)).

### **2.3. Auswertung auf Bestandsebene**

Ein Bestand wurde schlussendlich als positiv gewertet, sofern die untersuchten Oral Fluids oder die daraus gebildeten Poolproben sowohl bei der PAN-PCV2-qPCR wie auch der Genotyp-spezifischen qPCR ein positives Ergebnis lieferten.

Daraus ergibt sich, dass in Summe in 37,2% (32/86) der Bestände der Nachweis von PCV2 gelang. In 11,6% (10/86) der Bestände ist PCV2a nachweisbar, in 4,7% (4/86) PCV2b und in 18,6% PCV2d. In 2,3% (2/86) der Bestände waren jeweils zwei Genotypen nachweisbar, einmal PCV2a und PCV2b und einmal PCV2b und PCV2d.

Die Verteilung der Genotypen unter den 32 positiven Beständen zeigt sich so: 31,3% (10/32) sind dem Genotyp PCV2a zuzuordnen, positiv für PCV2b sind 12,5% (4/32) und der Genotyp PCV2d wurde in 50,0% (16/32) der positiven Bestände nachgewiesen. Zwei Bestände weisen eine gleichzeitige Infektion von jeweils zwei Genotypen auf, ein Bestand ist positiv für PCV2a und PCV2d (3,1%), ein anderer für PCV2b und PCV2d (3,1%).

### **2.4. Auswertung der Bestandsergebnisse in der Verbreitung über die Bundesländer hinweg**

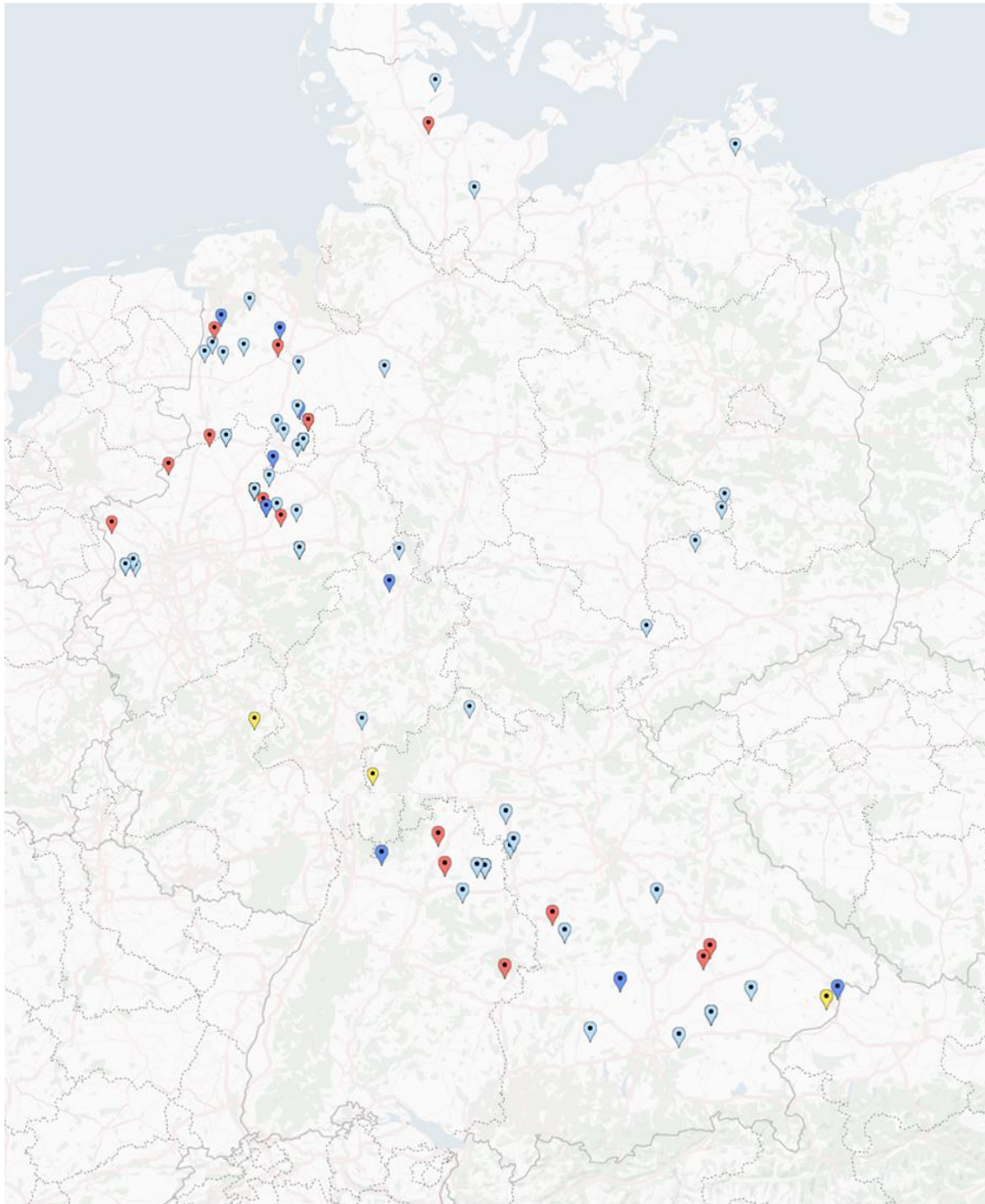
Die Verteilung der PCV2-DNA positiven Bestände und das Vorkommen der Genotypen PCV2a, PCV2b und PCV2d in den Bundesländern ist in Tabelle 8 aufgeführt.

**Tabelle 8: Vorkommen der PCV2-Genotypen (%) in den jeweiligen Bundesländern sowie positive Bestände**

Bundesland	Positive Bestände in % (n)	PCV2a in % (n)	PCV2b in % (n)	PCV2d in % (n)
Baden- Württemberg	62,5% (5/8)	20,0% (1/5)	-	80,0% (4/5)
Bayern	38,9% (7/18)	28,6% (2/7)	28,6% (2/7)	42,9% (3/7)
Brandenburg	0,0% (0/1)	-	-	-
Hessen	33,3% (1/3)	100,0% (1/1)	-	-
Mecklenburg- Vorpommern	0,0% (0/1)	-	-	-
Niedersachsen	36,4% (8/22)	62,5% (5/8) <sup>1</sup>	-	50,0% (4/8) <sup>1</sup>
Nordrhein- Westfalen	34,6% (9/26)	22,2% (2/9)	22,2% (2/9) <sup>2</sup>	66,7% (6/9) <sup>2</sup>
Rheinland Pfalz	100,0% (1/1)	-	100,0% (1/1)	-
Sachsen	0,0% (0/1)	-	-	-
Sachsen-Anhalt	0,0% (0/1)	-	-	-
Schleswig- Holstein	33,3% (1/3)	-	-	100% (1/1)
Thüringen	0,0% (0/1)	-	-	-
Gesamt	37,2% (32/86)	32,4% (11/32)	14,7% (5/32)	52,9% (18/32)

<sup>1</sup>ein Bestand mit Nachweis von PCV2a und PCV2d<sup>2</sup>ein Bestand mit Nachweis von PCV2b und PCV2d

## 2.5. Geographische Verteilung der untersuchten Bestände mit Untersuchungsergebnis sowie Darstellung der jeweiligen Genotypen



**Abbildung 6: Deutschlandweite Verteilung der Bestände mit PCV2-Nachweis und deren Genotyp**

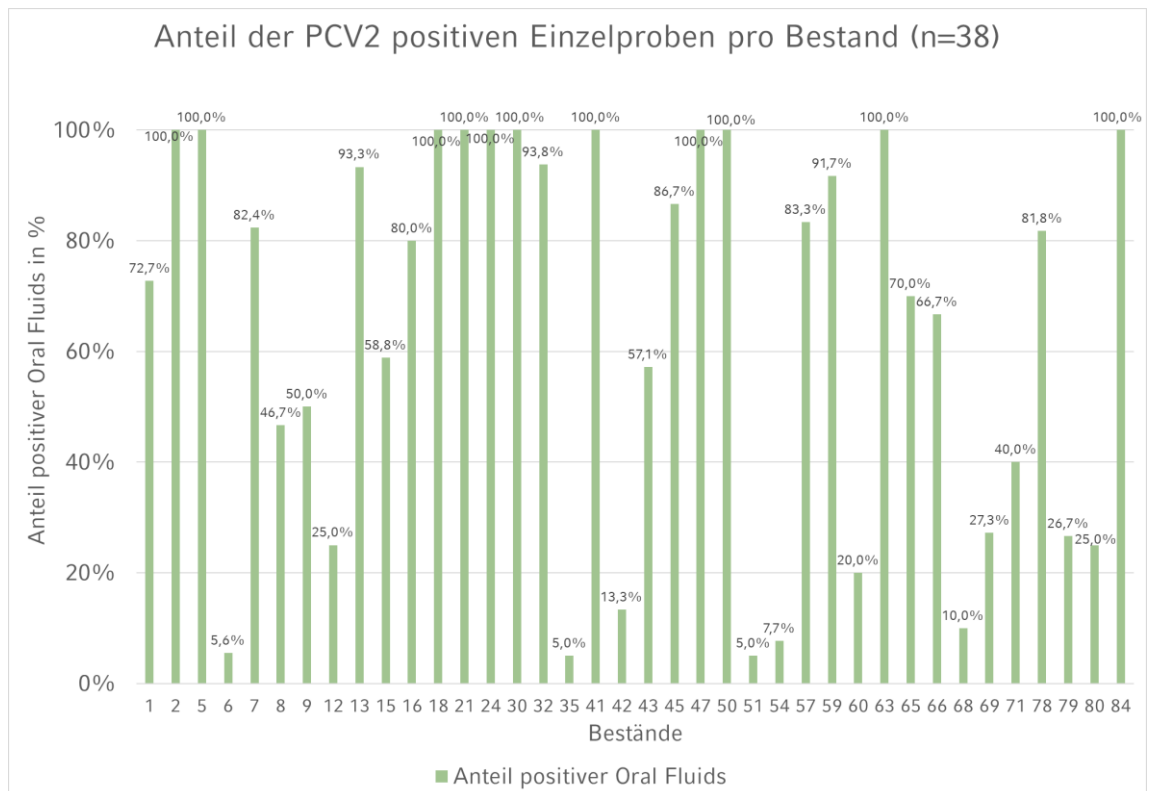
blau: PCV2a, gelb: PCV2b, rot: PCV2d,  
hellblau: Bestände ohne PCV2-Nachweis

Quelle: <https://de.batchgeo.com/map/ee3504c4a8727c38952148563d8f2841>



## 2.6. Molekularbiologische Auswertung der aufgelösten Pools (OF's) auf Bestandsebene

Insgesamt waren im ersten Screening im Mittel 28,2% (min: 0,0%; max: 100,0%; Std.-Abweichung: 39,6%) der ausgewerteten Proben je Bestand positiv. Innerhalb der PCV2-positiven Bestände sind im Mittel 70,3% (min: 5,0%; max: 100,0%; Std.-Abweichung: 32,0%) der ausgewerteten Kaustrickproben positiv für PCV2-DNA. Abbildung 7 zeigt den Anteil positiver Oral Fluids an den untersuchten Oral Fluids innerhalb der ausgewerteten Bestände.



**Abbildung 7: Anteil der im Screening positiven Einzelproben (n=344) an den zurückgesandten Proben (n=1275) aller Bestände mit positivem Ergebnis im ersten Screening, aufgeschlüsselt nach den jeweiligen Beständen**

### **3. Assoziation zwischen bestandsspezifischen Faktoren und dem Nachweis PCV2 spezifischer Genomfragmente in Oral Fluids**

#### **3.1. Betriebsform**

Der Nachweis von PCV2-DNA gelang in 35,5% (22/62) der reinen Mastbestände und in 41,7% (10/24) der geschlossenen Bestände. Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Betriebsform und dem Nachweis von PCV2-DNA in Oral Fluids.

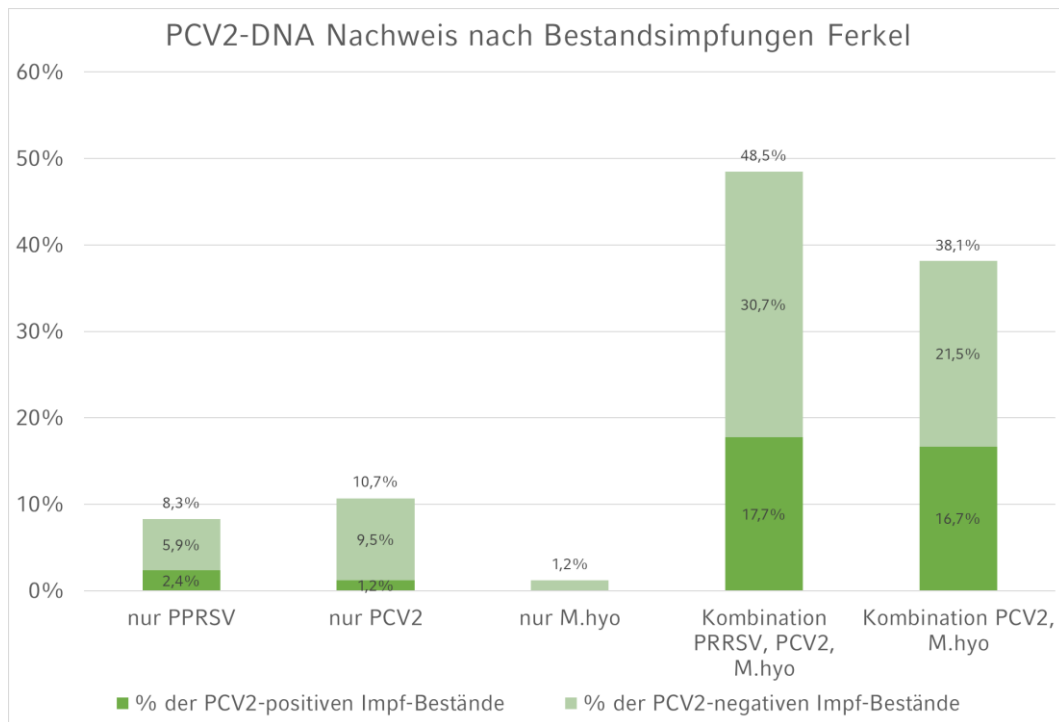
#### **3.2. Bestandsmanagement**

##### **3.2.1. Impfreime**

Als weitere Faktoren wurden auch die verschiedenen Vakzinationsschemata einzeln betrachtet, wobei sowohl die Ferkelimpfungen (n=84 Bestände) als auch die Sauenimpfungen (n=56 Bestände) mit eingeflossen sind.

Wie der Anteil der Bestände mit positivem Nachweis von PCV2 in den Beständen mit verschiedenen Ferkelimpfungen verteilt ist, zeigt Abbildung 8.

Es ergeben sich keine signifikanten Assoziationen zwischen den Impfungen und dem Nachweis von PCV2-DNA in Oral Fluids.



**Abbildung 8: PCV2-DNA Nachweis der Bestände mit unterschiedlichen Bestandsimpfungen bei Ferkeln (n=84)**

Die Sauenimpfungen sowie der Anteil PCV2 positiver Bestände innerhalb dieser Impfgruppen ist in Tabelle 9 dargestellt. Ein Zusammenhang zwischen den einzelnen Impfungen und dem Nachweis von PCV2 in Oral Fluids konnte nur für die Sauenimpfung gegen Parvovirose und Rotlauf festgestellt werden. Bei Beständen, welche eine Impfung gegen Parvovirose und Rotlauf, durchführen sind 42,0% (21/50) positiv für PCV2-DNA in Oral Fluids. Keiner der Bestände (n=6), die diese Muttersauenimpfung nicht durchführen, ist PCV2-positiv. Die Impfung gegen Parvovirose und Rotlauf bei den Muttertieren zeigt einen statistisch signifikanten Zusammenhang ( $p=0,045$ ) mit dem Nachweis von PCV2 in Oral Fluids. Bestände, die eine Sauenimpfung gegen Parvo/Rotlauf durchführen, haben eine um 1,724-fach erhöhte Chance auf den Nachweis von PCV2-DNA im Oral Fluid (OR:1,724; KI: 1,362-2,183).

Für die weiteren erfassten Impfungen ergeben sich keine signifikanten Assoziationen zwischen dem Einsatz der Impfstoffe und dem Nachweis von PCV2-DNA in Oral Fluids.

**Tabelle 9: PCV2-DNA Nachweis in Beständen mit unterschiedlichen Bestandsimpfungen der Sauen**

Sauenimpfungen	Anteil positiver Bestände	Anteil negativer Bestände	p-Wert
PRRS	38,6% (17/44)	61,4% (27/44)	0,737
ohne PRRSV	33,3% (4/12)	66,7% (8/12)	
PCV2	29,2%(7/24)	70,8% (17/24)	0,265
ohne PCV2	43,8% (14/32)	56,3% (18/32)	
M. hyo	37,5% (6/16)	62,5% (10/16)	1,000
ohne M. hyo	37,5% (15/40)	62,5% (25/40)	
Parvo/Rotlauf	42,0% (21/50)	58,0% (29/50)	<b>0,045</b>
ohne Parvo/Rotlauf	-	100,0% (6/6)	
Influenza	34,8%(8/23)	65,2%(15/23)	0,726
ohne Influenza	39,4% (13/33)	60,6% (20/33)	
E. coli	37,5%(6/16)	62,5% (10/16)	1,000
ohne E.coli	37,5% (15/40)	62,5% (25/40)	
<i>Rhinitis atrophicans</i>	-	100,0% (2/2)	0,265
ohne <i>Rhinitis atrophicans</i>	38,9% (21/54)	61,1% (33/54)	
APP	40,0% (2/5)	60,0% (3/5)	0,904
ohne APP	37,3% (19/51)	62,7% (32/51)	
Glässer	27,3% (3/11)	72,7% (8/11)	0,434
ohne Glässer	40,0% (18/45)	60,0%(27/45)	
Salmonellen	100,0% (1/1)	-	0,193
ohne Salmonellen	36,4%(20/55)	63,6%(35/55)	

### 3.2.2. Belegung und Zukaufsroutine

Bei den Untersuchungen der Bestandsmanagement-Faktoren wie auch bei Zukaufsoptionen ergaben sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge, alle Faktoren sind einzeln in Tabelle 10 aufgeführt.

**Tabelle 10: Faktoren das Bestandsmanagement und die Zukaufsroutine betreffend in Assoziation mit dem Nachweis von PCV2 in den Beständen, Aufgliederung der Anteile positiv und negativ gewerteter Bestände**

Faktor	Anteil positiver Bestände	Anteil negativer Bestände	p-Wert
kontinuierliche Belegung	33,3% (4/12)	66,7% (8/12)	0,739
Rein-Raus Belegung	38,4% (28/73)	61,6% (45/73)	
Krankenbucht zur Separation	36,9% (31/84)	63,1% (53/84)	0,705
keine Möglichkeit der Separation	50,0% (1/2)	50,0% (1/2)	
Krankenbucht mit Kontakt zum restliche Tierbestand	31,0% (9/29)	69,0% (20/29)	0,333
abgeschottete Krankenbucht	41,8% (23/55)	58,2% (32/55)	
Reintegration Kranker zur Gruppe	42,9% (6/14)	57,1% (8/14)	0,660
Keine Reintegration separierter Tiere	36,6% (26/71)	63,4% (45/71)	
Kümmerer bleiben bei Gruppe	43,1% (25/58)	56,9% (33/58)	0,239
Kümmerer werden separiert	29,2% (7/24)	70,8% (17/24)	
Kümmerer werden zu Jüngeren gestallt	16,7% (1/6)	83,3% (5/6)	0,279
kein Zurückstallen von Kümmerern	39,2% (20/51)	60,8% (31/51)	
Leerstand			
Kategorie 1	62,1% (18/29)	37,9% (11/29)	0,595
Kategorie 2	60,8% (31/51)	39,2% (20/51)	
Kategorie 3	66,7% (2/3)	33,3%(1/3)	

<b>Ferkelherkunft</b>			
eine Herkunft	38,2% (29/76)	61,8% (47/76)	0,712
zwei Herkünfte	25,0% (2/8)	75,0% (6/8)	
vier oder mehr Herkünfte	50,0% (1/2)	50,0% (1/2)	
aus Deutschland	35,0% (28/80)	65,0% (52/80)	0,302
aus den Niederlanden	66,7% (2/3)	33,3% (1/3)	
aus Dänemark	66,7% (2/3)	33,3% (1/3)	

### 3.2.3. Ferkelverluste und Kennzahl Therapiehäufigkeit im Zusammenhang mit dem Nachweis von PCV2-DNA in Oral Fluids

#### 3.2.3.1. Kategorisierte Auswertung

In Tabelle 11 sind die Anteile der Bestände der jeweiligen Kategorien der Ferkelverluste in Abhängigkeit des Nachweises von PCV2-DNA in Oral Fluids dargestellt. Der Nachweis von PCV2-DNA in Oral Fluids zeigt keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit den Ferkelverlust-Kategorien.

**Tabelle 11: Assoziation des PCV2-DNA Nachweises in Oral mit der Kategorien der Ferkelverluste**

Kategorie der Ferkelverluste	I	II	III	IV	p-Wert
Anteil der PCV2-DNA positiven Bestände	9,7% (3/31)	71,0% (22/31)	16,1% (5/31)	3,2% (1/31)	0,582
Anteil der PCV2-DNA negativen Bestände	18,0% (9/50)	56,0% (28/50)	22,0% (11/50)	4,0% (2/50)	

Aus Tabelle 12 kann die kategorisierte Therapiehäufigkeit hinsichtlich der Verteilung der Bestände mit PCV2-Nachweis entnommen werden. Auch hier konnte keine Assoziation mittels Chi-Quadrat-Test festgestellt werden.

**Tabelle 12: Zusammenhang des PCV2 Nachweises mit den Kategorien der Kennzahl der Therapiehäufigkeit**

Kategorie Kennzahl Therapiehäufigkeit	I	II	III	p-Wert
Anteil der PCV2-DNA positiven Bestände	81,5% (22/27)	11,1% (3/27)	7,4% (2/27)	0,859
Anteil der PCV2-DNA negativen Bestände	77,3% (34/44)	11,4% (5/44)	11,4% (5/44)	

### 3.2.3.2. Metrische Auswertung

Zusätzlich zur kategorialen Betrachtung wurden auch die Mediane für die nicht normalverteilten Datensätze der Kennzahl der Therapiehäufigkeit und der Ferkelverluste hinsichtlich einer möglichen Assoziation mit dem Nachweis von PCV2-DNA in Oral Fluids überprüft. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kennzahl der Therapiehäufigkeit und der Ferkelverluste bei Beständen mit oder ohne Nachweis von PCV2-DNA in Oral Fluids festgestellt werden.

### 3.2.4. Tiergesundheitsindices im Zusammenhang mit dem Nachweis von PCV2-DNA in Oral Fluids

Mittels Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben wurde auf eine mögliche Assoziation zwischen dem Nachweis von PCV2 und erfassten Tiergesundheitsindices untersucht. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden.

### 3.3. Assoziation bestandsspezifischer Faktoren mit der Nachweisrate der Genotypen PCV2a, PCV2b und PCV2d in Oral Fluids

Für folgende Auswertungen wurde jeweils der Nachweis eines Genotyps in den Beständen in Vergleich zum Nicht-Nachweis dieses Genotyps untersucht. Somit werden auch die Bestände mit gleichzeitiger Infektion mit zwei Genotypen berücksichtigt.

#### 3.3.1. Betriebsform

Die Verteilung der Genotypen hinsichtlich der Betriebsform sind in Tabelle 13 dargestellt. Es konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Betriebsform und dem Nachweis von PCV2b und dem Nachweis von PCV2d in Oral Fluids festgestellt werden.

**Tabelle 13: Zusammenhang zwischen der Betriebsform und des Nachweises der Genotypen von PCV2**

	PCV2a	p-Wert	PCV2b	p-Wert	PCV2d	p-Wert
Mastbestände	30,4% (7/23)	0,652	4,3% (1/23)	<b>0,010</b>	65,2% (15/23)	<b>0,044</b>
geschlossenes System	36,4% (4/11)		36,4% (4/11)		27,3% (3/11)	



Der Nachweis von PCV2b ist in Mastbeständen seltener als bei geschlossenen Systemen. Unter den Beständen mit PCV2b-Nachweis sind 20,0% (1/5) Mastbestände. Es werden 80,0% (4/5) der Bestände mit PCV2b-Nachweis im geschlossenen System bewirtschaftet. Bei Betrachtung der Bestände mit Nachweis anderer Genotypen zeigt sich, dass in 84,4% (27/32) der positiven Bestände PCV2a und/oder PCV2d nachweisbar sind, hiervon entfallen 22,2% (6/27) auf geschlossene Bestände und 77,8% (21/27) auf reine Mastbestände. Die Chance, dass ein PCV2-positiver Bestand mit PCV2b infiziert ist, ist in geschlossenen Beständen 12,6-fach erhöht. Das 95%-Konfidenzintervall zeigt Werte von 1,198 bis 131,901.

PCV2d ist in Mastbeständen signifikant häufiger nachzuweisen als in geschlossenen Beständen. Bei Betrachtung der PCV2-positiven Mastbestände zeigt sich, dass in 65,2% (15/23) der Bestände PCV2d nachweisbar ist, nur 34,8% (8/23) gehören zu anderen Genotypen. Die Verteilung der Genotypen innerhalb der geschlossenen Systeme mit PCV2-Nachweis zeigt, dass davon 27,3% (3/11) PCV2d-positiv sind während hingegen 72,7% (8/11) mit einem anderen Genotyp infiziert sind. Die Chance, dass ein PCV2-positiver Bestand den Genotyp PCV2d aufweist, ist in reinen Mastbeständen 5-fach erhöht. Das 95%-Konfidenzintervall ergibt 0,987 bis 25,341.

### **3.3.2. Bestandsmanagement**

Es ergeben sich für sämtliche Faktoren des Bestandsmanagements keine signifikanten Assoziationen zwischen den jeweiligen Variablen und der Nachweisrate von PCV2a, PCV2b und PCV2d.

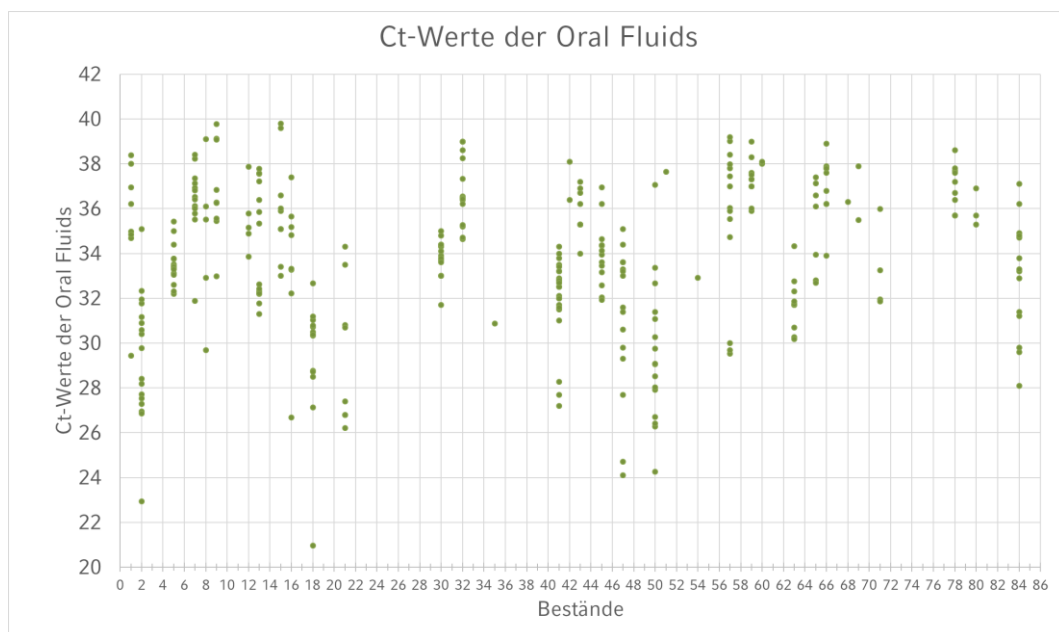
Es konnte kein Einfluss des Nachweises der Genotypen PCV2a, PCV2b und PCV2d auf die kategorisierten Ferkelverluste über die Mastdauer hinweg und die kategorisierte Kennzahl der Therapiehäufigkeit dargestellt werden. Auch beim Vergleich der Nachweisraten der Genotypen mit den metrischen Ferkelverlusten und der Kennzahl der Therapiehäufigkeit konnte kein statistisch signifikanter Unterschied dargestellt werden.

Eine Assoziation des Nachweises der Genotypen PCV2a, PCV2b und PCV2d und den erfassten Tiergesundheitsindices konnte nicht ermittelt werden.

#### 4. Quantitative Auswertung der molekularbiologischen Untersuchung der Oral Fluids mittels Ct-Werten

Als Grundlage für diese quantitative Auswertung der Untersuchungsergebnisse wurden die Ct-Werte der einzelnen PCR-Untersuchungen nach ZHAO et al. (2010) modifiziert nach EDDICKS et al. (2016) verwendet, sowohl die der Poolproben als auch die der Einzelproben.

In folgender Aufstellung werden Ergebnisse der PCR Untersuchung der Einzelproben, die aus positiven Poolproben stammten, aufgeführt. In dieser Darstellung werden nur die Ct-Werte der Proben, die positiv gewertet wurden, aufgeführt. Die PCR-Untersuchung dieser einzelnen Oral Fluids ergab im Mittel den Ct-Wert 33,7 (min. 21,0; max: 39,8) bei einer Standardabweichung von 3,4. In nachfolgender Grafik (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) sind die Ct-Werte der untersuchten Proben innerhalb der Bestände aufgetragen.



**Abbildung 9: Aufstellung der Ct-Werte aller Einzelproben innerhalb der PCV2-positiven Bestände**

#### 4.1. Anteil der positiven Oral Fluids pro Bestand in Korrelation mit entsprechenden Ct-Werten der Einzeluntersuchungen

Bei der Untersuchung auf einen möglichen Zusammenhang zwischen den Ct-Werten der Einzelproben und sowohl dem Anteil PCV2-positiver einzelner Oral Fluids des Bestands wie auch der metrischen „Gesundheitskennzahlen“ mittels Korrelation nach Spearman für nicht normalverteilte Daten ergab sich eine Assoziation zwischen dem ermittelten Ct-Wert und dem Anteil der positiven einzelnen Oral Fluids, wie auch dem Atemwegsscore, dem Orangscore, dem Gliedmaßenscore und auch der Kennzahl der Therapiehäufigkeit. Die jeweiligen Zusammenhänge sind in Tabelle 14 dargestellt. In diese Betrachtung sind nur positive Bestände miteingeflossen. Je niedriger der Ct-Wert in der PCR Untersuchung der Oral Fluids ist, desto anteilig mehr Einzelproben des Bestands sind positiv. Je höher die Ct-Werte der PCR-Untersuchung sind, desto niedriger ist der Atemwegs- und Organscore der Bestände. Je niedriger die Ct-Werte sind, desto niedriger ist der Gliedmaßenscore und auch die Kennzahl der Therapiehäufigkeit der Bestände. Diese Zusammenhänge sind statistisch signifikant.

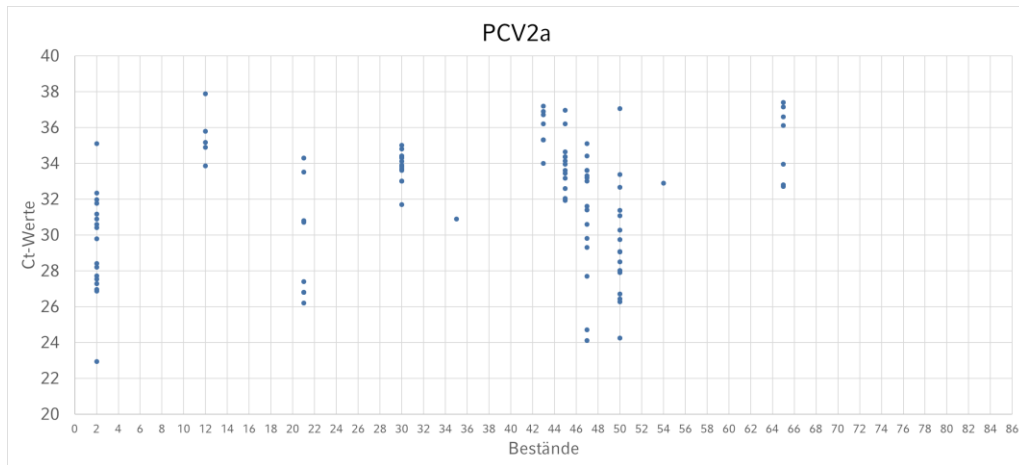
**Tabelle 14: Korrelation zwischen den ermittelten Ct-Werten der Einzeluntersuchungen mit dem Anteil der positiven Einzelproben der jeweiligen Bestände**

Faktoren der Korrelation mit den Ct-Werten	r	
	(Korrelationskoeffizient nach Pearson)	p-Wert
Anteil positiver OF's der Bestände	-0,322	<b>0,000</b>
Ferkelverluste	0,004	0,948
Atemwegsscore	-0,210	<b>0,003</b>
Organscore	-0,396	<b>0,000</b>
Gliedmaßenscore	0,277	<b>0,000</b>
Unversehrtheit	-0,124	0,070
Kennzahl Therapiehäufigkeit	0,204	<b>0,000</b>

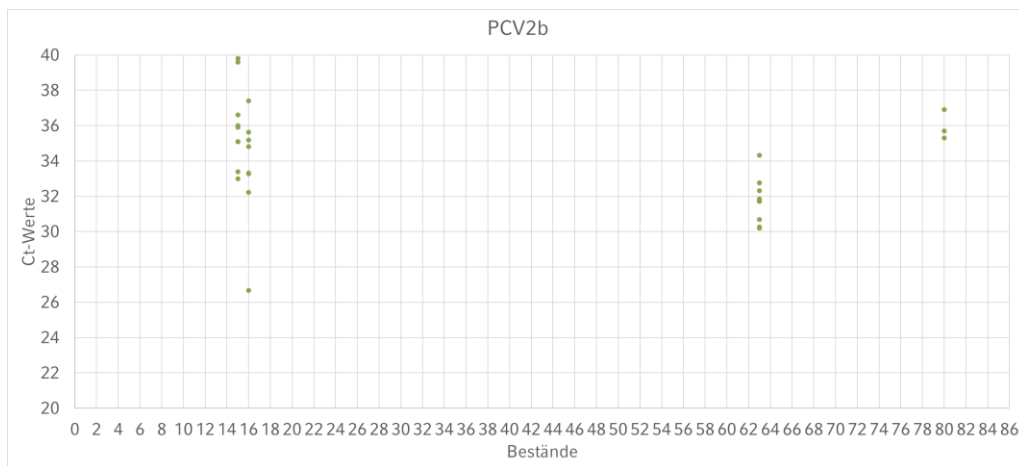
#### **4.2. Assoziation der ermittelten Ct-Werte mit dem Nachweis der Genotypen PCV2a, PCV2b und PCV2d**

Eine mögliche Assoziation zwischen den Genotypen und der Höhe der ermittelten Ct-Werte der PCR-Untersuchungen sowohl der Poolproben als auch der Einzelproben konnte nicht gezeigt werden.

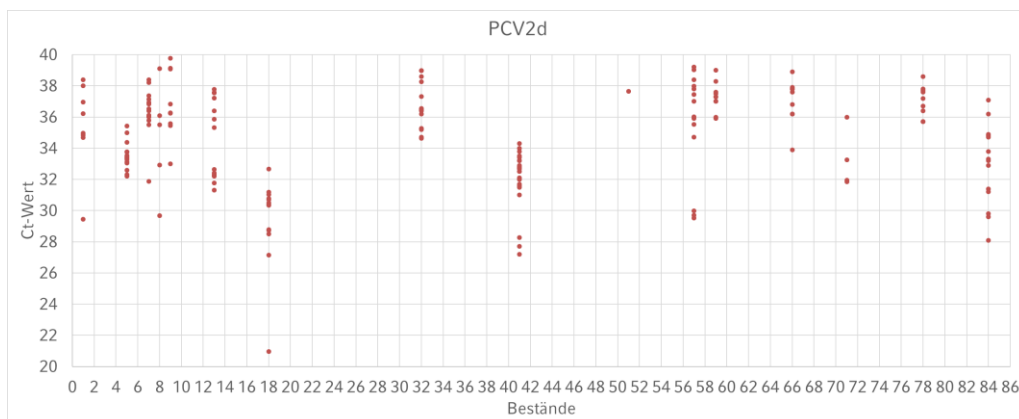
Die ermittelten Ct-Werte der Bestände sind aufgegliedert nach Genotypen in Abbildung 10, Abbildung 11 und Abbildung 12 graphisch nach Beständen gegliedert aufgeführt.



**Abbildung 10: Ct-Werte der positiven Oral Fluids der Bestände mit Nachweis von PCV2a**



**Abbildung 11: Ct-Werte der positiven Oral Fluids der Bestände mit Nachweis von PCV2b**



**Abbildung 12: Ct-Werte der positiven Oral Fluids der Bestände mit Nachweis von PCV2d**

## **V. DISKUSSION**

### **1. Auswahl der Studienpopulation**

Die vorliegende Arbeit wurde als randomisiertes „two stage cluster sampling“ geplant, um das Vorkommen von PCV2 und dessen Genotypen deutschlandweit abbilden zu können. Diese Vorgehensweise sollte eine Aussage über die Prävalenz von PCV2 und dem Vorkommen von PCV2-Genotypen in deutschen Schweinemastbeständen ermöglichen. In vielen Untersuchungen zur Erfassung des Vorkommens von PCV2 und dessen Genotypen wurden die Bestände vorselektiert. Oft werden Bestände oder auch nur Probenmaterial verwendet, welches zur Routinediagnostik in veterinärmedizinische Labors gebracht wird. Eine Aufstellung dieser verschiedenen Untersuchungen und auch des verschiedenen Untersuchungsmaterials ist in Tabelle 1 der Literaturübersicht aufgeführt. Auf klinisch auffällige Bestände als Studienbetriebe griffen beispielsweise XIA et al. (2019), WANG et al. (2020), MUKHERJEE et al. (2018) und DE BOISSÉSON et al. (2004) zurück. Auch in der Untersuchung von RATZKE (2019) wurden die Bestände selektiert eingeschlossen. Es handelte sich um sogenannte klinische Proben aus Beständen mit vorberichtlichen Atemwegsproblemen. Eine Aussage über eine gesamtdeutsche Prävalenz von PCV2 lässt sich mit einer solchen Studienpopulation nicht treffen. In den Untersuchungen von CHIOU et al. (2012) und XU et al. (2019) wurde gezielt darauf selektiert, dass in den Beständen PCV2-assoziierte klinische Auffälligkeiten nachweisbar sind. In retrospektiven Analysen wie bei WIEDERKEHR et al. (2009) und JACOBSEN et al. (2009) wurde asserviertes und teils paraffinkonserviertes Probenmaterial verwendet. Allerdings greifen auch manche Forschergruppen zur Ermittlung der Nachweisrate von PCV2 in Schweinebestände auf die Untersuchung von Monitoringprogrammen zurück, hierbei werden keine klinischen Auffälligkeiten mitbedacht. PUVANENDIRAN et al. (2011) wie auch DVORAK et al. (2016) untersuchten die Nachweisrate von PCV2 in US-amerikanischen Schweinebeständen, die Auswahl erfolgte über das National Animal Health Monitoring Systems (NAHMS). Auch RAMOS et al. (2017)

untersuchten randomisierte Bestände im Rahmen eines Monitoringprogramms aus verschiedenen Regionen Uruguays. Die Vorgehensweise der Verwendung klinischer Proben zur Abschätzung der Prävalenz von PCV2 und dessen Genotypen führt möglicherweise dazu, dass die bis dato publizierten Daten die Nachweisrate von PCV2 und dessen Genotypen in der Hausschweinpopulation überschätzen. Gerade bei PCV2 ist die Selektion von Material aus klinischen Proben problematisch, da PCV2 vor allem bei bestehenden Ko-Infektionen vermehrt nachzuweisen ist (KIM et al., 2003). HANSEN et al. (2010) wiesen in pathophysiologisch auffälligen Lungen diverse Bakterien und Viren nach. Am häufigsten wurde PCV2 neben *M. hyopneumonie*, *M. hyorhinis* und *Pasteurella multocida* nachgewiesen. In Tieren aus klinisch auffälligen Beständen ist vermutlich deutlich häufiger PCV2 nachweisbar als in unauffälligen Beständen. PALZER et al. (2008) zeigten bei der Untersuchung von Tieren mit respiratorischer Symptomatik im Vergleich zu klinisch unauffälligen Tieren, dass PCV2 häufiger in erkrankten Tieren nachweisbar ist. Mögliche klinische Assoziationen von PCV2 sind nicht nur respiratorische Erkrankungen, auch andere Organsysteme wie das Nervensystem, Lymphgewebe, das Reproduktionssystem, der Gastro-Intestinal-Trakt, der Harntrakt oder auch die Haut können betroffen sein (OPRIESSNIG & LANGOHR, 2013). PCV2 ist bei klinischen Auffälligkeiten dieser Organsysteme eine wichtige Differentialdiagnose. Daraus kann sich ergeben, dass bei Betrachtung klinischer Fälle die Nachweisrate von PCV2 höher eingestuft wird. PCV2 ist ubiquitär in der Schweinpopulation, besonders in klinisch auffälligen Beständen ist die Nachweisrate erhöht (SEGALÉS, 2012). Der Nachweis von PCV2-DNA kann mit diversen Erkrankungen verbunden werden, die eindeutige Ätiologie dieser klinischen Auffälligkeiten ist nicht immer definitiv auf PCV2 zurückzuführen, aber ein Einfluss von PCV2 auf die klinische Erscheinung kann bestehen (SEGALÉS, 2012). Der Nachweis von PCV2 erscheint somit möglicherweise häufiger in klinisch auffälligen Tieren möglich zu sein. Die randomisierte Vorgehensweise in der eigenen Untersuchung sollte diese Problematik umgehen und stellt somit eine bessere Datengrundlage für weitere Untersuchungen dar als die über klinische Proben ermittelten Daten.



### **1.1. Regionale Unterschiede in der Nachweisrate von PCV2**

Die Auswahl der Bestände in der vorliegenden Studie erfolgte gewichtet nach der Anzahl der Bestände der jeweiligen Bundesländer um die Schweinedichte in bestimmten Regionen widerzuspiegeln. Aus den Bundesländern mit den meisten schweinehaltenden Beständen, Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen, wurden jeweils 22 und 26 Bestände mit in die Untersuchung eingeschlossen.

Bisherige Studien zeigten bereits, dass die Schweinedichte einer Region einen Einfluss auf die Nachweisrate von PCV2 haben kann (RITZMANN et al., 2002). In dieser Untersuchung war beispielsweise in Niederbayern, einer sehr schweinedichten Region, die Nachweisrate von PCV2 höher als in Franken. Die Bezirke Mittel- und Oberfranken charakterisieren hierbei eine Region mit deutlich geringerer Bestandsdichte an schweinehaltenden Betrieben. Die retrospektive Auswertung von Serumproben klinisch auffälliger Tiere von 1999 bis 2001 zeigt in niederbayrischen Beständen eine PCV2-Nachweisrate von 69% (RITZMANN et al., 2002), in Mittel- und Unterfranken ist lediglich in 39% der untersuchten Bestände PCV2 nachweisbar. Allerdings gilt es zu beachten, dass die Untersuchung aus 2002 vor der Einführung der flächendeckenden Impfung gegen PCV2 durchgeführt wurde, was zu einer anderen Datengrundlage als in vorliegender Studie führt. In den eigenen Untersuchungen hingegen ist in 97,6% der Bestände die Impfung gegen PCV2 etabliert. Und es zeigen sich im Vergleich der Nachweisraten schweinedichter Regionen mit dem Bundesdurchschnitt lediglich marginale Unterschiede. In Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen ist die Rate der Bestände mit PCV2-Nachweis sogar numerisch geringer. Insgesamt wurde in 37,2% (37/86) der Bestände PCV2-DNA nachgewiesen werden, in Niedersachsen waren 36,4% (8/22) positiv für PCV2-Genom, in Nordrhein-Westfalen 34,6% (9/26). In Regionen mit deutlich weniger Schweinebeständen wie Rheinland-Pfalz, Mecklenburg-Vorpommern, Brandenburg, Sachsen, Sachsen-Anhalt zeigt sich ein uneinheitliches Bild. Aufgrund des two-stages-cluster-samplings bei dieser Studie entfällt jeweils lediglich ein Bestand auf diese Bundesländer, dadurch ist die ermittelte Nachweisrate in diesen

Bundesländern wenig belastbar. Ergebnisse analoger Arbeiten, mit randomisierter Bestandsauswahl, sind für Deutschland nicht verfügbar, dadurch können die eigenen Daten nicht vergleichend diskutiert werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, dass PCV2 noch immer, wie bereits von SEGALÉS et al. (2005) berichtet, ubiquitär in der Hausschweinpopulation verbreitet ist, sodass regionale Unterschiede in Bezug der Nachweisrate detektierbar sind.

## **1.2. Bestandsstrukturen als Risikofaktoren für den Nachweis von PCV2**

Obwohl eine randomisierte Auswahl der Untersuchungsbestände erfolgte, ergeben sich, bedingt durch die standardisierte Tierhaltung in der Schweineproduktion, Schnittmengen bestimmter Charakteristika in der Studienpopulation, die hinsichtlich eines möglichen Einflusses auf den Nachweis von PCV2 untersucht wurden. Eine detaillierte Beschreibung der Bestände der Studienpopulation ist im Anhang dieser Arbeit aufgeführt. Jedoch waren weder die Betriebsform noch die meisten Managementfaktoren mit der Nachweisrate von PCV2 signifikant assoziiert (Vgl. IV. 3.).

Es konnte die Bestandsimpfung der Sauen gegen PPV und Rotlauf als Risikofaktor für den Nachweis von PCV2 dargestellt werden. Dieser Zusammenhang kann darin begründet liegen, dass Bestände impfen, da sie Probleme mit klinischen Auffälligkeiten im Spektrum von PPV sehen. Ein Rückschluss auf PCV2 ist insofern möglich, dass diese beiden Erreger häufig gemeinsam auftreten (OPRIESSNIG et al., 2014b). Die Nachweisraten von PCV2 und PPV sind in Fällen von porcine-circovirus-diseases (PCVD) signifikant höher als in klinisch unauffälligen Beständen (OPRIESSNIG et al., 2014b). Auch ROSE et al. (2003) wiesen PPV als Risikofaktor für PCV2-assoziierte klinische Auffälligkeiten nach. Der in vorliegender Untersuchung nachgewiesene Zusammenhang ist also nur insofern kausal, dass Landwirte mit klinischen Problemen impfen, jedoch weiterhin Tiere im Bestand haben, die das Virus ausscheiden können. In Beständen ohne klinische Auffälligkeiten in diesem Spektrum zirkulieren diese Erreger vermutlich eher in geringerem Maße, was wiederum die

Nachweisrate erniedrigt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Zusammenhang dieser Impfung mit dem Nachweis von PCV2 besteht, sich aber möglicherweise daraus keine praktischen Schlussfolgerungen ableiten lassen.

Andere Studien zeigten durchaus auch, dass die Nachweisrate von verschiedenen Faktoren beeinflusst ist. In der Untersuchung von RATZKE (2019) zeigte sich eine höhere Nachweisrate von PCV2 bei Proben aus den Niederlanden, im Gegensatz zur Untersuchung in Deutschland und der Schweiz. Die höhere Nachweisrate wurde über die Tierdichte und vor allem über den stetigen Tierhandel erklärt. In vorliegender Studie konnte keine höhere Nachweisrate von PCV2 in Kastrickproben aus den Niederlanden importierter Mastschweine beobachtet werden. Dies gilt auch für Bestände mit kürzeren Leerstandszeiten und damit häufigeren Tierwechseln.

Auch in der Untersuchung von WALHÖFER (2015) zeigte sich, dass keine Rückschlüsse auf den Zusammenhang zwischen bestandsspezifischen Faktoren und dem Nachweis von PCV2 festgestellt werden. Als möglicher Parameter wurde hier, neben verschiedenen Impfschemata, ein Hygienescore entwickelt. Dieser beinhaltet verschiedene Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen sowie äußere Gegebenheiten wie die Schweinedichte der Region. Ein Zusammenhang zwischen diesem Hygienescore und dem Nachweis von PCV2 konnte nicht bestätigt werden (WALHÖFER, 2015). Der Autor weist allerdings zusätzlich darauf hin, dass ein möglicher Einfluss auch durch die geringe Bestandsanzahl nicht erkennbar gewesen sein könnte. In der hier vorliegenden Arbeit ist eine deutlich größere Anzahl an Beständen beprobt worden, hinsichtlich des Hygienemangements, auch wenn hier andere Parameter verwendet wurden, konnten auch keine Einflussfaktoren auf den Nachweis von PCV2 benannt werden.

Ebenso kommen auch umfassendere Studien, welche sich mit möglichen Einflussfaktoren auf die Nachweisrate von PCV2 beschäftigten, zu einem ähnlichen Schluss. LÓPEZ-SORIA et al. (2005) untersuchten 63 Bestände um Zusammenhänge zwischen verschiedensten Charakteristika und dem klinischen Status der Bestände zu eruieren. Die in dieser Studie untersuchten Parameter beschäftigen sich mit Managementfaktoren, die in ähnlicher Weise in vorliegender Arbeit verwendet wurden. Insgesamt wurden in dieser Studie 191 Variablen in die Analyse mitaufgenommen. Es wurden Betriebsstrukturen abgefragt, Reproduktionsdaten und Remontierungsarten erfasst, stallbauliche Voraussetzungen wie auch Hygiene- und Biosicherheitsmaßnahmen analysiert. Zusätzlich wurden auch diverse Impfschemata als Parameter mitaufgenommen. Hier zeigte sich ein möglicher Einfluss der Muttersauenvakzination gegen PRRSV und *Rhinitis atrophicans* für das Auftreten von PMWS, also auch indirekt mit dem Nachweis von PCV2, in den untersuchten Beständen, bei allen anderen Faktoren konnte kein Zusammenhang nachgewiesen. Die vorliegende Studie kommt zu einem ähnlichen Schluss, der Nachweis von PCV2 ist vermutlich unabhängig von bestandspezifischen Einflussfaktoren.

Auch die Forschergruppe um ROSE et al. (2003) beschäftigte sich mit Einflussfaktoren auf PCV2-assoziierte klinische Erscheinungen. Förderlich für das Auftreten von PMWS, sind, laut ROSE et al. (2003), Ko-Infektionen mit PPV und PRRSV, wie auch die Besamung der Sauen durch bestandseigene Eber und zusätzlich die Aufstallung in großen Stallungen. Einen möglichen Schutz vor dem Ausbruch von PMWS bieten lange Leerstandzeit, regelmäßige Ektoparasitenbehandlungen und die Gruppenhaltung der Sauen während der Trächtigkeit. Zusammengefasst weisen ROSE et al. (2003) darauf hin, dass eine stressfreie Umgebung im Bestand die Wahrscheinlichkeit für einen PMWS-Ausbruch vermindert. PCV2 ist als ätiologisch für PMWS anzusehen, dadurch kann die Analyse der Risikofaktoren für PMWS auch auf den Nachweis von PCV2 übertragen werden (SEGALÉS, 2012). Wichtig für die Einordnung dieser Studie ist, dass die Daten in den Jahren 1998 - 2001 gesammelt wurden. Diese Erhebung fand somit vor der Einführung der flächendeckenden

Impfung gegen PCV2 statt. Durch die Impfung sind die klinischen Auffälligkeiten im Zusammenhang mit PCV2 deutlich rückläufig (KIXMÖLLER et al., 2008). Auch MADEC et al. (1999) beschäftigen sich mit einem ausführlichen 20 Punkte umfassenden Plan von Bekämpfungsmaßnahmen gegen PCV2. Dieser umfasst neben allgemeinen Hygieneanforderungen auch Managementoptimierungen wie Stallklima, Immunprophylaxe und Zusammenstallung der Tiere (MADEC et al., 1999). Zusätzlich sind darin auch Bestandsmanagementfaktoren aufgeführt, welche sich besonders auf die Aufstallungsform, das Stallklima und die Futterbeschaffenheit beziehen. Die Neugruppierung der Tiere soll vermieden werden, Impfmaßnahmen sollen individuell abgestimmt sein und zugekaufte Tiere erst einmal separat in Quarantäne gestellt werden. Auch die Fütterung sollte optimiert werden, hochwertige Eiweißquellen und eine ausreichende Vitaminversorgung müssen gewährleistet sein (MADEC et al., 1999). Die Beachtung von mindestens 16 der 20 aufgeführten Punkte soll zu einer effektiven Vorbeugung PCV2-assoziiierter Erkrankungen führen.

All diese Verbesserungen des Bestandsmanagements sind wichtige Bausteine für die Gesunderhaltung der Schweine im Bestand, allerdings helfen sie nur die möglichen Ausprägungen von PCV2 zu minimieren, nicht das Virus an sich zu eliminieren. Dies bestätigt wiederum nur die ubiquitäre Verbreitung von PCV2 in der Hausschweinpopulation (SEGALÉS et al., 2005).

## **2. Nachweis von PCV2-spezifischen-Genomfragmenten mittels Oral Fluids**

In der vorliegenden Arbeit wurden Oral Fluid Proben aus 86 Betrieben mittels PCR auf das Vorkommen von PCV2-Genom untersucht.

### **2.1. Oral Fluids als Ausgangsmaterial für Diagnostik**

In der Literatur wird der Nachweis von PCV2 bei Analysen verschiedener Ausgangsmaterialien mittels PCR beschrieben (SEGALÉS, 2012). Die molekularbiologische Untersuchung von Organproben, vor allem aus lymphatischem Gewebe ist sehr gut geeignet für den Nachweis von PCV2-Genom (BOLIN et al., 2001). Im Rahmen einer Querschnittsuntersuchung ist eine invasive Probennahme allerdings schwerlich praktikabel und ethisch nicht vertretbar. Eine deutlich einfachere Art der Probennahme sind Oral Fluids (PRICKETT & ZIMMERMAN, 2010). Für die Detektion von experimentellen Infektionen geben PRICKETT et al. (2011) eine diagnostische Spezifität von 98% - 100% an. In der Untersuchung von Tiergruppen, die in der elften Lebenswoche experimentell infiziert wurden, konnte über den gesamten Versuchszeitraum (98 Tage nach Infektion) PCV2-DNA mittels qPCR im Kaustreck nachgewiesen werden (PRICKETT et al., 2011).

Des Weiteren verglichen NIELSEN et al. (2018) bei diagnostischer Aufarbeitung von zwei PCV2-positiven Beständen die Möglichkeiten des Nachweises von PCV2-Genom in gepoolte Serumproben und Oral Fluids. Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den DNA-Gehalt in Oral Fluids und Serumproben konnte nicht festgestellt werden, allerdings war PCV2-DNA in mehr Oral Fluid Proben als in den gepoolten Serumproben nachweisbar. NIELSEN et al. (2018) gehen davon aus, dass PCV2-DNA zuerst im Oral Fluid nachweisbar ist, bevor die Testschwelle von gepoolten Serumproben erreicht ist. Oral Fluids eignen sich hervorragend für den Nachweis von PCV2 auf Herdenebene (NIELSEN et al., 2018). Deshalb wurde auch in vorliegender Studie auf eine diagnostische Aufarbeitung mittels Oral Fluids zurückgegriffen. Die Probengewinnung durch Kaustreife ist eine sowohl für den Menschen als

auch für das Tier schonende Untersuchungsmöglichkeit und gerade für PCV2 äußerst verlässlich. Oral Fluids sind eine zukunftsorientierte Methode der Diagnostik in der Schweinemedizin. Speziell für den Nachweis von PCV2-DNA mittels PCR sind Oral Fluids besonders geeignet.

Obwohl die Gewinnung von Oral Fluids eine äußerst einfache und effektive Methode um Ausgangsmaterialien für diagnostische Zwecke zu sammeln darstellt und mit dieser Art der Probennahme die Untersuchung einer Tiergruppe oder eines Bestands möglich ist, bleibt fraglich, ob auch wirklich alle Tiere der zu beprobenden Gruppe beteiligt am Probenmaterial sind.

SEDDON et al. (2012) zeigten in einer Untersuchung, dass in konventionellen Stallungen bereits nach 15 Minuten 92% der Schweine den Strick bekaut haben, aber mit längerer Expositionsdauer des Kaustricks der Anteil an Tieren, die mit diesem interagiert haben steigt (SEDDON et al., 2012). Für die vorliegende Untersuchung wurde deshalb eine Beprobungszeit von 20 bis 25 Minuten festgelegt, um möglichst vielen Tieren den Strick zum Bekauen zur Verfügung zu stellen. Von einem längeren Zeitraum wurde aufgrund der heftigen Interaktion der Mastschweine mit dem Diagnostiktool verzichtet. Mastschweine erkunden neue Gegenstände in der Bucht äußerst genau und bekauen jeden Gegenstand, der sich neu in ihrer Umgebung befindet (DAY et al., 1995). Die zur Probennahme verwendeten Kaustricke wurden bereits nach dieser Zeit zu Teilen aufgefressen.

Ein Faktor, dass nicht die Proben aller Tiere in einem Stallabteil miteinfließen, kann die Rangordnung sein (CRAIG, 1986). Es besteht die mögliche Gefahr daraus, dass rangniedrigere Tiere von Ranghöheren von dem aufregenden neuen Spielzeug, dem Beprobungsstrick, verdrängt werden (CRAIG, 1986). In der eigenen Untersuchung wurde zur Abmilderung dieses Phänomens bei einer Tiergruppe von mehr als 20 Schweinen ein zweiter Strick in derselben Bucht verwendet.

Inwieweit mittels Oral Fluids tatsächlich eine Aussage über die Prävalenz von PCV2 im Speichel der Tiere gemacht werden kann ist unklar. PCV2-DNA lässt sich mittels PCR in nahezu allen Körperflüssigkeiten nachweisen (ROSE et al., 2012) und wird sowohl über den Kot als auch über Mundhöhlenflüssigkeiten ausgeschieden (SHIBATA et al., 2003). Eine Kontamination der Oral Fluids mit Kot und anderen Umweltbestandteilen, welche die Schweine bekaut haben, ist zwar sehr wahrscheinlich, spielt aber für die vorliegende Studie eher eine untergeordnete Rolle. Es soll die Prävalenz auf Bestandsebene ausgedrückt werden, die Frage aus welchem Material genau diese Erkenntnis gewonnen werden kann, ist eher von geringer Bedeutung. Auch wenn Oral Fluids die durch Bekauen von Stricken gewonnen werden, für die Einzeltierdiagnostik von geringem Wert sind, ermöglichen sie es doch, die Infektion von PCV2 auf Bestandsebene zu diagnostizieren und weiterführende Untersuchungen zu veranlassen. NIELSEN et al. (2018) zeigten sogar, dass die Virusmenge, welche in Oral Fluids nachgewiesen wird, zumeist höher ist als in gepoolten Serumproben, was die Sensitivität der Methode bestätigt.

## **2.2. Qualitative Auswertung des Screenings auf PCV2-Genom**

Die hier mittels Oral Fluids ermittelte Prävalenz von PCV2 auf Bestandsebene ist mit 37,2% deutlich geringer als nationale (RITZMANN et al., 2002; EDDICKS et al., 2018b) und internationale (WIEDERKEHR et al., 2009; XIA et al., 2019) Vergleichsstudien zeigten. Ein Überblick über aktuelle Nachweisraten verschiedener Autoren ist in Tabelle 1 in der Literaturübersicht dargestellt. Ein wichtiges Alleinstellungsmerkmal der vorliegenden Studie zu den meisten anderen ist die Auswahl der Studienpopulation. In vergleichbaren Untersuchungen aus Deutschland von RATZKE (2019) oder RITZMANN et al. (2002) wurden entweder Bestände mit wiederkehrenden Atemwegsproblematiken oder sogenannte klinische Proben der Routinediagnostik eingeschlossen.

Die Nachweisrate von PCV2-DNA aus Serumproben bei klinisch auffälligen Beständen von RATZKE (2019) lag in Deutschland bei 42,4% (25/59) und bei RITZMANN et al. (2002) bei 61%. Die gezielte



Vorselektion erklärt die große Differenz in der Nachweisrate zur aktuellen Untersuchung. Ein zusätzlicher Faktor für die Divergenz beider genannten Untersuchungen kann die Tatsache sein, dass im Untersuchungszeitraum der Studie von RITZMANN et al. (2002) noch kein Impfstoff gegen PCV2 verfügbar war, dies kann ursächlich für eine höhere Nachweisrate von PCV2 sein.

Auch WIEDERKEHR et al. (2009) zeigten in einer retrospektiven Analyse archivierter klinischer Proben eine deutlich höhere PCV2-Nachweisrate (74,6%) als in der eigenen Untersuchung. Für diese Studie wurde paraffin-eingebettetes Untersuchungsmaterial der Veterinärpathologie der Universität Zürich verarbeitet. Die Vorselektion des Ausgangsmaterials für die Untersuchung spielte hier wiederum eine relevante Rolle, da vor allem klinisch erkrankte Tiere in die Untersuchungsergebnisse miteingeflossen sind.

Ebenso liegen für Asien kaum Daten aus randomisierten Untersuchungen über die Prävalenz von PCV2 in der Hausschweinpopulation vor. XIA et al. (2019) berichten eine PCV2-Nachweisrate von 50% in Nordost-China. Diese Untersuchung beinhaltet die Detektion von PCV2-DNA mittels PCR in Proben aus klinisch auffälligen und unauffälligen Beständen. Für Zentral-China publizieren XU et al. (2019) eine PCV2-Nachweisrate von 57%. Im Gegensatz liegt die von KIM et al. (2018) veröffentlichte Nachweisrate von PCV2 aus Untersuchungen zur Routinediagnostik aus klinisch auffälligen Beständen mit 36,3% zwar deutlich niedriger als in China aber nahezu im vergleichbaren Bereich der eigenen Untersuchung. Jedoch bildet keine der genannten Studien eine realistische Einschätzung der Prävalenzsituation ab, da wie auch in europäischen Studien kein zufälliges Beprobungsschema gewählt wurde.

Nordamerikanische Untersuchungen aus sowohl klinisch auffälligen wie auch unauffälligen Beständen berichten für den Zeitraum zwischen 2016 und 2018 eine Nachweisrate von 16,4% (WANG et al., 2020). Auch diese Proben stammen aus der Routinediagnostik eines veterinärmedizinischen Labors in Kansas und können somit nicht für eine belastbare Prävalenzaussage herangezogen werden.

Im internationalen Vergleich lassen sich allerdings auch Studien aufführen, die eine ähnliche Studienpopulation aufweisen. PUVANENDIRAN et al. (2011) ermittelten 2006 eine PCV2-Prävalenz von 82,6%. Diese Untersuchung war Teil des National Animal Health Monitoring Systems (NAHMS) und zeigt somit eine randomisierte Bestandsauswahl. Allerdings ist bei Betrachtung dieser Daten wichtig zu bedenken, dass diese Untersuchung vor Einführung der flächendeckenden Impfung gegen PCV2 stattgefunden hat. In einer nachfolgenden Analyse aus dem Jahr 2012 ermittelten DVORAK et al. (2016) mittels Serumproben eine PCV2-Prävalenz von 17,2% in der US-Mastschweinepopulation. Die Autoren schließen daraus, dass die flächendeckende Impfung gegen PCV2 zu einem deutlichen Rückgang des PCV2-Nachweises in Serumproben geführt hat.

Die Unterschiede in der Nachweisrate zwischen der eigenen und der nordamerikanischen Untersuchung von DVORAK et al. (2016) liegen zum einen am Untersuchungsmaterial als auch an der Studienpopulation. Während in der eigenen Untersuchung Schweine in der 18. Lebenswoche untersucht wurden, wurden bei DVORAK et al. (2016) Tiere, die älter als 20 Wochen waren, beprobt. Zusätzlich konnte bereits in anderen Untersuchungen gezeigt werden, dass Ergebnisse hinsichtlich der Epidemiologie von PCV2 aus den USA nicht immer mit europäischen Untersuchungsergebnissen übereinstimmen. Als Beispiel sind hierfür die unterschiedlichen Ergebnisse zur Beurteilung einer möglichen diaplazentaren Übertragung von PCV2 zu nennen. Sowohl EDDICKS et al. (2016) als auch DIESTE-PÉREZ et al. (2018) halten diese Form der vertikalen Infektion für eher nachrangig in der Epidemiologie von PCV2, während hingegen amerikanische Autoren wie DVORAK et al. (2013) und SHEN et al. (2010) großen Fokus auf diesen Übertragungsweg legen und ihn als bedeutend einstufen. Dies zeigt nur anhand eines Beispiels die Divergenz der Forschungsergebnisse zwischen Nordamerika und Europa, dieser Unterschied wird auch im Vergleich der Prävalenzen zwischen der vorliegenden Untersuchung mit dem internationalen Vergleichswert deutlich.

Die vorliegende Studie bestimmt zum ersten Mal in einer randomisierten Untersuchung die Prävalenz von PCV2-positiven Mastbeständen in Deutschland. Es muss jedoch beachtet werden, dass dieses Ergebnis lediglich für die untersuchte Altersgruppe (18. Lebenswoche, Endmastschweine) gilt und sich die Nachweisraten in anderen Altersgruppen unterscheiden können. Jedoch wurde die 18. Lebenswoche bewusst ausgewählt, da sich in vorangegangenen Untersuchungen in geimpften Schweinepopulationen die Endmast als gut geeignet dargestellt hat um PCV2-DNA zu detektieren (HAAKE et al., 2014; EDDICKS et al., 2017). Für die vorliegende Arbeit wurde als Beprobungszeitpunkt die 18. Lebenswoche der Tiere festgelegt. Obwohl klinische Auffälligkeiten, welche mit PCV2 assoziiert sind, bereits deutlich früher, zu Beginn der Aufzuchtphase hauptsächlich auftreten (HARDING & CLARK, 1997), sind die meisten Tiere erst deutlich später virämisch (SZIKORA, 2015). Auch in der Untersuchung von RITZMANN et al. (2002) ist die Nachweisrate von PCV2 mit steigendem Alter der beprobten Schweine positiv korreliert. Lediglich 13% der untersuchten Feten waren positiv für PCV2, 23% der untersuchten Saugferkel und 45% der untersuchten Absetzferkel (RITZMANN et al., 2002). Die höchste Nachweisrate von 68% wiesen Mastschweine auf (RITZMANN et al., 2002). Auch in der Verlaufsuntersuchung von Tieren aus neun verschiedenen geimpften Beständen von SZIKORA (2015) geht hervor, dass der Anteil virämischer Tiere bis zur 20. Lebenswoche ansteigt. Zur Untersuchung des PCV2-Status wurden hier Tiere in der ersten Lebenswoche eingeschlossen und dann engmaschig in der 3., 4., 8., 12., 16., 20. und 24. Lebenswoche mittels Serumproben untersucht. Ein Anstieg der Anzahl virämischer Schweine ist im Bereich der Mittel- und Endmast erkennbar (SZIKORA, 2015). Die Auswahl der 18. Lebenswoche der Schweine als Zeitraum der Beprobung stützen auch die Untersuchungen von KIXMÖLLER et al. (2008) und FACHINGER et al. (2008). Bei diesen Untersuchungen stieg der Anteil virämischer Tiere bis zur 18. Lebenswoche an und sank danach wieder.

Die Beprobung in der 18. Lebenswoche zeigt sich somit als guter Zeitpunkt zum Nachweis von PCV2 in Oral Fluids. Mehrere Studien belegen die Korrelation der Virämie mit der Ausscheidung von PCV2 (KIM, 2010; RAMIREZ et al., 2012; HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017). Deshalb ist der Zeitpunkt der Virämie der meisten Tiere am Geeignetsten zur Detektion von PCV2-DNA in Schweinmastbeständen mittels Oral Fluids.

### **2.3. Semiquantitative Auswertung von PCV2-Genomfragmenten in randomisiert ausgewählten Beständen**

In der vorliegenden Studie ist der Gehalt an PCV2-DNA in den Oral Fluids relativ gering. Der Gehalt an PCV2-DNA lässt sich über Ct-Werte der einzelnen PCR-Läufe semiquantitativ abschätzen. Je niedriger der Ct-Wert der PCR-Untersuchung, desto größer ist die Menge viraler DNA in der Probe (ZHAO et al., 2010). Im Mittel konnten Ct-Werte von 33,7 (min: 21,0; max: 39,8) bei einer Standardabweichung von 3,4 ermittelt werden.

Prinzipiell erlaubt die nachgewiesene Menge an Virus-DNA einen Rückschluss auf die klinische Relevanz des Befundes (OPRIESSNIG et al., 2007). Die Schwere des PCV2-assoziierten Krankheitsverlaufs korreliert positiv mit der Höhe des PCV2-Gehalts in Blut oder Gewebeproben (BRUNBORG et al., 2004; OLVERA et al., 2004). Mit schweren Krankheitsverläufen werden von den Autoren der beiden Studien DNA-Gehalte ab  $10^7$  Genomkopien/ml Serum oder 500µg Gewebe assoziiert, während DNA-Gehalte bis  $10^5$  Genomkopien/ml Serum bzw. 500µg Gewebe eher mit subklinischen PCV2-Infektionen in Verbindung gebracht werden (SEGALÉS, 2012). Ausgehend von diesen Werten sind die meisten der Bestände als subklinisch infiziert anzusehen, wobei für Oral Fluids bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Referenzwerte hinsichtlich der klinischen Relevanz publiziert wurden.

NIELSEN et al. (2018) konnten jedoch zeigen, dass die PCV2-DNA Gehalte in Oral Fluids höher liegen können als in dazugehörigen Serumproben, was bedeuten würde, dass die von BRUNBORG et al. (2004) und OLVERA et al. (2004) ermittelten Werte nicht für die Beurteilung der Untersuchungsergebnisse von Oral Fluids herangezogen werden sollten.

In der vorliegenden Studie konnten verschiedene Zusammenhänge zwischen der nachgewiesenen Menge viraler DNA und erfasster „Gesundheitskennzahlen“ festgestellt werden. Einerseits korrelieren sowohl Atemwegsscore als auch Organscore negativ mit den Ct-Werten der PCR-Untersuchungen andererseits korreliert der Gliedmaßenscore positiv mit den Ct-Werten. Es könnte also möglicherweise ein Zusammenhang zwischen einer größeren Virusmenge und einer besseren Atemwegsgesundheit und der allgemeinen klinischen Unauffälligkeit der Organsysteme bestehen. Eine höhere Virusmenge ist mit einer schlechteren „Gliedmaßengesundheit“ im Rahmen des hier ausgewerteten Tiergesundheitsindex assoziiert. Die Beobachtung, dass ein höherer PCV2-DNA-Gehalt und ein besserer Gesundheitszustand korrelieren, widerspricht zahlreichen Publikationen über die Bedeutung subklinischer als auch klinischer PCV2-Infektionen (BRUNBORG et al., 2004; OLVERA et al., 2004; OPRIESSNIG et al., 2007; SEGALÉS, 2012). Es sollte jedoch bedacht werden, dass eine Korrelation zwar signifikant sein kann, aber dieses Ergebnis keinen kausalen Zusammenhang darstellen muss.

Eine weitere Möglichkeit für diese Beobachtung könnte die Tatsache sein, dass PCV2 als immunsuppressives Pathogen (KIM et al., 2003; SEGALÉS, 2012) zu mehr klinisch relevanten bakteriellen Koinfektionen führt. Die Folge wäre ein vermehrter Einsatz antimikrobieller Wirkstoffe, was wiederum zu einer verbesserten Tiergesundheit führen könnte oder zumindest die bei der Schlachtierkörperuntersuchung sichtbaren Folgen limitiert.

Interessant ist, dass zwar ein Zusammenhang zwischen dem quantitativem PCV2-Nachweis und dem erhobenen Therapie-Index hergestellt werden konnte, aber diese Korrelation zeigt eine höhere Kennzahl der Therapiehäufigkeit bei höheren Ct-Werten. Diese Assoziation würde eine höhere Behandlungsinzidenz bei geringerer nachgewiesener DNA-Menge von PCV2 im Bestand implizieren. Bei der Beurteilung der Kennzahl der Therapiehäufigkeit ist der Unsicherheitsfaktor der zuständige Betriebsleiter. Einerseits sind nur Bestände, die Masttiere halten, zur Meldung der eingesetzten Chemotherapeutika mit antimikrobieller Wirkung verpflichtet, andererseits muss diese Meldung von den Betriebsleitern oder durch ihn autorisiert durchgeführt werden. In der Erfassung dieser Kennzahl stecken diverse personenbezogene Unwägbarkeiten, was diese Datengrundlage wenig zuverlässig erscheinen lässt. Über die Validität der Erfassung dieser Kennzahl gibt es derzeit keine Veröffentlichungen. In der vorliegenden Untersuchung wurde diese Kennzahl trotzdem miterfasst, um möglicherweise eine Kausalität im Einsatz von Chemotherapeutika im Bestand mit PCV2 assoziieren zu können. Aufgrund der Datengrundlage ergibt sich der Zusammenhang, dass eine geringere Menge an PCV2-DNA, eine häufigere Therapie mit sich zieht. Die Kausalität dieses Zusammenhangs kann aufgrund der oben beschriebenen Schwierigkeit bei der Interpretation der Kennzahl der Therapiehäufigkeit nicht bestätigt werden. Eine mögliche Teilinterpretation dieser Assoziation kann sein, dass durch die Behandlung bakterielle Sekundärerreger verdrängt werden, was wiederum zu einer reduzierten klinischen Assoziation von PCV2 führen kann (KIM et al., 2003). Eine mögliche Verbesserung der Herdengesundheit durch antimikrobiell wirksame Chemotherapeutika könnte insofern einen Einfluss auf die detektierte virale DNA-Menge haben, dass Ko-infektionen reduziert werden und somit auch klinische Ausprägungen reduziert werden. Dieser Zusammenhang ist allerdings als marginal zu betrachten, da der Einsatz antimikrobieller Wirkstoffe keinen Einfluss auf das Pathogen PCV2 an sich hat, sondern lediglich eine Verbesserung der Herdengesundheit mit sich bringen könnte.

Am wahrscheinlichsten zur Erklärung der nachgewiesenen Korrelationen ist die Überlegung, dass die nachgewiesenen DNA-Gehalte in den Oral Fluids keine klinisch relevante Rolle spielen. In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an PCV2-DNA in Oral Fluid Proben höher liegt als in zugehörigen Serumproben (FINLAISON & COLLINS, 2014; NIELSEN et al., 2018) und die Bedeutung höherer DNA Gehalte im Speichel für die klinische Relevanz überschätzt werden.

FINLAISON und COLLINS (2014) zeigen den Zusammenhang zwischen den ermittelten Ct-Werten von Oral Fluids und zugehörigen Serumproben. In allen untersuchten Buchten mit PCV2-Nachweis im Serum war auch PCV2-DNA im Oral Fluid nachweisbar. Die Autoren dieser Untersuchung zeigen, dass die Ct-Werte niedriger und somit die nachgewiesene Menge an viraler DNA in Oral Fluids höher sind als in den zugehörigen Serumproben (FINLAISON & COLLINS, 2014). Auch die Gruppe um HERNANDEZ-GARCIA et al. (2017) untersuchte eine mögliche Assoziation zwischen dem Vorliegen eines PRDC mit dem Nachweis von PCV2 in Kaustriekproben. In ihrer Studie zeigte sich, dass Oral Fluids aus Beständen mit klinischen Auffälligkeiten höhere Mengen an PCV2-DNA enthalten. HERNANDEZ-GARCIA et al. (2017) schlagen vor, zur Evaluation dieses Zusammenhangs eine longitudinale Untersuchung in Beständen mit unterschiedlichen Gesundheits-Status durchzuführen.

Der Nachweis lediglich geringer Mengen viraler DNA war bereits im Vorhinein anzunehmen, da 97,6% (82/84) der untersuchten Bestände eine Ferkelimpfung gegen PCV2 durchführen. PCV2-Genom ist zwar sowohl in geimpften als auch in ungeimpften Beständen nachweisbar (KIXMÖLLER et al., 2008), jedoch zeigten KIXMÖLLER et al. (2008), dass eine Ferkel-Immunisierung sowohl eine deutliche Reduktion der Anzahl virämischer Tiere als auch eine deutliche Verminderung der gefundenen Menge an PCV2-Virusgenom mit sich bringt.

FORT et al. (2008) zeigen, dass, auch wenn die Virämie signifikant reduziert wird, die Ausscheidung über Nasensekret oder Kot weiterhin nachweisbar ist, wenn auch geringer als bei nichtgeimpften Tieren. Diese

Beobachtung verdeutlicht, dass speziell in PCV2-geimpften Schweineherden Oral Fluids eine sensitivere Methode zum Nachweis von DNA mittels PCR darstellen als Serumproben. Die Ermittlung der Herdenprävalenz mittels der Darstellung virämischer Tiere kann in geimpften Herden gegen Null tendieren (FENG et al., 2014) und die tatsächliche Prävalenz somit deutlich unterschätzen.



### 3. Prävalenz von PCV2a, PCV2b und PCV2d

In der vorliegenden Untersuchung waren 37,2% (32/86) aller Herden positiv für PCV2-DNA in Oral Fluids. Für die PCV2-positiven Bestände lag die Verteilung der Genotypen somit bei 32,4% für PCV2a, in 14,7% der Bestände konnte PCV2b und in 52,9% PCV2d nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse folgen dem globalen Trend des Genotypen-Shifts hin zu PCV2d (XIAO et al., 2015). In einer vorangegangenen Untersuchung von Serumproben deutscher Schweinebestände aus dem Jahr 2015 zeigte sich noch eine andere Verteilung der Genotypen. In 53,3% der PCV2-positiven Bestände war PCV2a nachweisbar, in 34,9% PCV2b und lediglich in 11,6% PCV2d (EDDICKS et al., 2018b). Es konnte also gezeigt werden, dass auch in Deutschland in den letzten Jahren die Nachweisrate von PCV2d massiv zunimmt, während sich hingegen die Nachweisrate von PCV2b mehr als halbiert hat. Die Nachweisrate von PCV2a ist im Vergleich der beiden Studien im zeitlichen Verlauf relativ stabil. Somit lässt sich sagen, dass der international beobachtete Shift zu PCV2d (XIAO et al., 2015; KWON et al., 2017) sich auch analog in deutschen Schweinemastbeständen vollzieht. PCV2d ist der aktuell am häufigsten nachgewiesene Genotyp. Obwohl die Protektivität von PCV2a-basierten Impfstoffe auch für diesen Genotyp gegeben ist (OPRIESSNIG et al., 2020) bleibt fraglich ob eine Weiterentwicklung dieser Prophylaxemaßnahme aufgrund der hohen Nachweisrate von PCV2 nicht angemessen wäre. Bei Einführung der kommerziellen Impfstoffe wurde PCV2a am häufigsten nachgewiesen (CARMAN et al., 2008), deshalb wurde dieser Genotyp auch als Basis für diese Impfstoffe verwendet. Wie bereits oben beschrieben stellt die Einführung der flächendeckenden Impfung eine weitreichende Verbesserung in der Bekämpfung von PCV2-assoziierten klinischen Erscheinungen dar (KIXMÖLLER et al., 2008). Ob und inwiefern ein Impfstoff, zugeschnitten auf den aktuell vorherrschenden Genotyp PCV2d, einen genauso weitreichenden Einfluss auf die Schweinehaltung bleibt fraglich. Weitere Studien die sowohl das Vorkommen der Genotypen von PCV2 weiterhin überwachen oder auch möglicherweise die prophylaktischen Maßnahmen reevaluieren sollten durchgeführt werden.

### **3.1. Assoziation der Betriebsform mit der Nachweisrate der Genotypen von PCV2**

PCV2d konnte nicht nur über alle Bestände am häufigsten nachgewiesen werden, sondern auch besonders häufig bei spezialisierten reinen Mastbeständen. PCV2b hingegen ist häufiger in geschlossenen Systemen nachweisbar. Der globale Trend des Genotypen-Shifts scheint zuerst in den Mastbeständen voranzuschreiten, die geschlossenen Systeme sind eher mit bereits länger etablierten Genotypen wie PCV2b infiziert.

PCV2 verändert sich stetig, neue Genotypen entstehen und breiten sich dann aus. Diese äußerst rapide Veränderung des Virus, wie die Veränderung der Genotypen, ist an sich für DNA-Viren untypisch (XIAO et al., 2015). Die hohe Variabilität im Genom von PCV2 ergibt sich aus Punktmutationen und Rekombinationen von gleichzeitig zirkulierenden Stämmen (FIRTH et al., 2009). In einer retrospektiven Analyse von Nukleotidsequenzen der Genbank zeigten FIRTH et al. (2009) eine Rate von  $1,2 \times 10^{-3}$  Nukleotidänderungen pro Nukleotid und Jahr. Diese hohe Veränderungsrate des Genoms von PCV2 ist ein Grund dafür, dass immer wieder neue Genotypen entstehen können und die Diversität des Virus auch weiterhin zunimmt. Warum sich manche Genotypen stärker bzw. schneller verbreiten ist nicht entgültig geklärt. Unbedingte kausale bestandsspezifische Faktoren für die Veränderung des vorherrschenden Genotyps können zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht definiert werden (XIAO et al., 2015).

Eine oft diskutierte These ist, dass der Transport asymptomatischer, allerdings infizierter Tiere die Verbreitung vorantreibt (FIRTH et al., 2009). Diese Beobachtung kann zum Teil auch mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie gestützt werden. Der Transport der Tiere, welche in reinen Mastbeständen aufgestellt sind, ist zwangsläufig ein Unterscheidungsmerkmal zu geschlossenen Beständen. BÜTTNER et al. (2013) konnten zeigen, dass sowohl Vermehrerbeständen als auch Ferkelerzeugern eine bedeutende Rolle bei der Verbreitung von Pathogenen zukommen kann. PCV2d kann als neuer Erreger in der Schweinepopulation über diese Wege leichter verteilt werden. In

geschlossenen Beständen, bei denen der zwischenbetriebliche Transport von Tieren nicht vorkommt, sind möglicherweise deshalb nicht so häufig mit PCV2d infiziert. PCV2b ist schon über einen längeren Zeitraum weit in der Schweinepopulation verbreitet (EDDICKS et al., 2017). Der Tierverkehr und auch die Neugruppierung von Tieren bei der Umstallung in den Mastbestand ist ein Risiko für den Nachweis von PCV2d zu sein. Diese Faktoren unterstützen den relativ neu in der Schweinepopulation zirkulierenden Genotyp PCV2d in seiner Verbreitung. Mögliche Ursachen hierfür könnten Selektionsvorteile, die durch Mutationen entstehen, darstellen (XIAO et al., 2015). Weitere Studien zur genauen Analyse des Genotypen-Shifts und vor allem zur definitiven Klärung der Ursachen dieser Veränderungen sind noch nötig.

### **3.2. Klinische Relevanz des Nachweises von PCV2**

In der vorliegenden Arbeit wurden diverse „Gesundheitsindikatoren“ betrachtet, zum einen die Ferkelverluste, wie auch die Tiergesundheitsindices der QS in Bezug auf Atemwegsgesundheit, Organgesundheit, Gliedmaßen-Gesundheit und sonstige Unversehrtheit der Schlachtkörper. Diese Indices, welche am Schlachthof ermittelt werden, lassen Rückschlüsse über die Tiergesundheit im Mastbestand zu (QS QUALITÄT UND SICHERHEIT GMBH, 2018). Eine negative Korrelation zeigen sich sowohl beim Atemwegs- als auch beim Organscore, dieser Zusammenhang implementiert eine höhere Herdengesundheit bei niedrigeren PCV2 Ct-Werten, also einer höheren Viruslast.

Im Gegensatz dazu zeigt NICKOLL (2018) in der Untersuchung von zehn oberbayrischen Beständen mit vorberichtlicher Lungenproblematik einen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von PCV2 und einem höheren Anteil an Pleuritiden und Lungenauffälligkeiten. Jedoch zeigt diese Studie auch diverse Koinfektionen als Risikofaktoren für Schlachthofbefunde mit Lungenassoziation auf. Die massiven Auffälligkeiten am Schlachthof lassen sich zusammenfassend auf den PRDC zurückführen (NICKOLL, 2018), PCV2 ist ein bedeutender Faktor in diesem Krankheitsgeschehen, allerdings nicht alleinig ätiologisch (KIM et al., 2003). Die erhobenen Gesundheitsindices geben Aufschluss über die Herdengesundheit des

Bestands, vor allem der Atemwegsscore und der Organscore zeigen mögliche Veränderungen im Spektrum des PRDC (KIM et al., 2003; QS QUALITÄT UND SICHERHEIT GMBH, 2018). Wie bereits beschrieben ist die direkte Kausalität dieser Assoziationen zwischen den Gesundheitsindikatoren und dem Nachweis von PCV2 nicht unbedingt gegeben. Möglicherweise wird die klinische Relevanz des Nachweises von PCV2-DNA in Oral Fluids überschätzt.

## **4. Praktische Möglichkeiten von Oral Fluids zum Monitoring von PCV2**

### **4.1. Probennahme durch Landwirte**

In der vorliegenden Studie wurden über 90% der Bestände von den Landwirten selbst beprobt. Die Betriebsleiter wurden telefonisch über das Vorgehen dieser Studie informiert. In der Literatur ist eine Beprobung durch die Betriebsleiter oder auch Angestellte im landwirtschaftlichen Sektor als durchaus aussagekräftig beschrieben (RAMIREZ et al., 2012). Auch hier wurden OF's untersucht die von Landwirten selbst genommen wurden. Es zeigte sich, dass diese Proben auch nach Versand noch sehr gut labordiagnostisch verwendbar waren (RAMIREZ et al., 2012).

Der Rückversand in der hier durchgeführten Studie ist jeweils am Anfang der Woche mit beigelegter Kühlmöglichkeit erfolgt. Allerdings waren die äußeren Umstände im Beprobungszeitraum von März bis Dezember sehr unterschiedlich. Die Außentemperaturen reichten von -5 bis +40°C. Bei gekühltem Versand ist auch eine längere Transportdauer kein Problem (FINLAISON & COLLINS, 2014). PCV2 ist ein äußerst stabiles Virus. Beispielsweise zeigen experimentelle Versuche, dass nach 13-tägiger Lagerung bei 4°C der Ct-Wert lediglich um 1,5 Werte steigt (FINLAISON & COLLINS, 2014). Selbst die Lagerung bei 37°C beeinflusst das Ergebnis der PCR-Untersuchung nur minimal (FINLAISON & COLLINS, 2014). Einerseits ist PCV2 als Virus, wie gerade beschrieben, äußerst resistent gegenüber Temperaturveränderungen und andererseits ist für die vorliegende Untersuchung unerheblich, ob das Virus noch vermehrungsfähig ist (HAMEL et al., 2000). Der Nachweis von Virus-DNA ist auch noch möglich, wenn nur noch Teilfragmente der Nukleinsäure in der Probe zu finden sind (ZHAO et al., 2010).

Die Methode der Probengewinnung mittels Kaustrieken ist auch sehr gut geeignet um von Menschen ohne tiermedizinische Kenntnis durchgeführt zu werden (RAMIREZ et al., 2012), anhand einfacher Erklärung ist eine Probennahme mit weitreichenden diagnostischen Möglichkeiten zu

erreichen. Oral Fluids können Ausgangsmaterial für Untersuchungen auf verschiedene Schlüsselerreger in der Schweinemedizin sein. Des Weiteren ist diese Art der Probengewinnung extrem tierschonend und optimal an das natürliche Verhalten der Tiere angepasst. Diese Möglichkeit der Bestandsdiagnostik ist eine Weiterentwicklung in der Schweinemedizin. Die Beprobung mithilfe der Landwirte durchzuführen ist eine kosteneffiziente und praktikable Option.

#### **4.2. Interpretation der erhaltenen Ct-Werte und deren Bedeutung für den gesamten Tierbestand**

Der relative Anteil positiver Kaustriekproben pro Bestand und die Höhe des Ct-Werts in den untersuchten Oral Fluids war negativ korreliert. Für diese Korrelation wurden nur Oral Fluids aus positiven Beständen in die Bewertung miteingeschlossen, sodass ein negatives Bias durch hohe Ct-Werte, bedingt durch negative Kaustriekproben, ausgeschlossen werden kann. Geringe Gehalte an viraler DNA in den Kaustrieken gehen in der vorliegenden Arbeit mit einer geringeren Anzahl PCV2-DNA positiver Stricke auf Bestandebene einher und umgekehrt.

Dieses Ergebnis erlaubt den Rückschluss, dass bei Vorliegen weniger aber deutlich positiver Kaustriekproben davon ausgegangen werden kann, dass ein Großteil der Schweine PCV2-positiv ist, beziehungsweise im Moment der Probennahme Ausscheider war und der Bestand möglicherweise ein Bestandsproblem mit PCV2 hat oder entwickeln könnte. In diesem Fall empfiehlt es sich weitergehende Diagnostik hinsichtlich der klinischen Relevanz im Bestand durchzuführen und ggf. das Impfmanagement und Bestandsmanagement zu überprüfen.

Oral Fluids sind eine zukunftsorientierte Methode der Diagnostik in der Schweinemedizin. Gerade für den Nachweis von PCV2-DNA mittels PCR sind Oral Fluids besonders geeignet. Die Sensitivität von Oral Fluids steht der von gepoolten Serumproben nicht nach (NIELSEN et al., 2018). Oral Fluids sind effiziente Ausgangsmaterialien für labordiagnostische Untersuchungen, sowohl für PCR-Untersuchungen wie auch für den Nachweis von Antikörpern (PRICKETT & ZIMMERMAN, 2010). Des

Weiteren sind Oral Fluids eine tierschutzkonforme und tierschonende Möglichkeit, Aufschluss über die Herdengesundheit zu geben (HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017).

Die Diagnostik mittels Kaustricken ist vielfältig einsetzbar, sie kann für diverse Krankheitserreger genutzt werden (PRICKETT & ZIMMERMAN, 2010). Oral Fluid Beprobungen können die Überwachung der Herdengesundheit erleichtern und vorantreiben. Die Kenntnis über den Status des Bestands innerhalb eines möglichen Infektionsgeschehens kann einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung neuer prophylaktischer Maßnahmen oder zum nötigen gezielten Einsatz einer Therapie leisten. Diese Weiterentwicklung in der Diagnostik kann maßgeblich zur Gesunderhaltung der Schweinepopulation beitragen.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

In vorliegender Studie wurden Oral Fluids aus 86 deutschen Schweinemastbeständen hinsichtlich des Nachweises von PCV2-Genom untersucht. Zusätzlich erfolgte die Zuordnung der PCV2-Nukleotidsequenzen zu den Genotypen PCV2a, PCV2b und PCV2d. Die Probennahme fand von März bis Dezember 2019 bei Tieren in der 18. Lebenswoche statt. Mittels qPCR wurde die Virus-DNA detektiert, im Anschluss daran wurden die positiven Proben anhand einer neuen *inhouse* Genotyp-spezifischen qPCR genotypisiert.

Die Nachweisrate von PCV2 dieser zufällig ausgewählten Bestände lag bei 37,2% (32/86). In 11,6% (10/86) der Bestände ist PCV2a nachweisbar, in 4,7% (4/86) PCV2b und in 18,6% (16/86) PCV2d. In 2,3% (2/86) der Bestände waren jeweils zwei Genotypen nachweisbar, einmal PCV2a und PCV2d und einmal PCV2b und PCV2d.

Bei PCV2-positiven Beständen stellt sich das Vorkommen der Genotypen wie folgt dar: In 31,3% (10/32) der positiven Bestände ist PCV2a nachweisbar, in lediglich 12,5% (4/32) PCV2b und sogar in 50,0% (16/32) PCV2d. Jeweils 3,1% (2/32) der Bestände zeigen Ko-infektionen mehrerer Genotypen, ein Bestand PCV2a und PCV2d und ein Bestand PCV2b und PCV2d.

Als mögliche Einflussfaktoren, sowohl auf die generelle Nachweisrate von PCV2 als auch auf das Vorkommen der Genotypen, wurden verschiedene bestandsspezifische Faktoren untersucht. Auf die Nachweisrate von PCV2 hat lediglich die Impfung der Muttertierherde gegen PPV und Rotlauf einen statistisch signifikant erhöhenden Effekt. Auf das Vorkommen der Genotypen hat lediglich die Betriebsform einen statistisch signifikanten Einfluss. PCV2d ist häufiger in spezialisierten Mastbeständen nachweisbar, während die Nachweisrate von PCV2b bei geschlossenen Beständen erhöht ist.

Es konnte weiterhin kein eindeutiger Zusammenhang zwischen klinischen Auffälligkeiten und dem Nachweis von PCV2 oder einem bestimmten Genotyp nachgewiesen werden.



Die Absenz von eindeutigen Einflussfaktoren sowohl auf die Nachweisrate von PCV2-DNA als auch auf die Verteilung der Genotypen unterstreicht den ubiquitären Charakter von PCV2.

In vorliegender randomisierter Studie lässt sich keine derart hohe Prävalenz wie im internationalen Vergleich ausweisen. Dies liegt in der Auswahl der Studienpopulation begründet, denn es erfolgte keine Vorselektion hin zu klinisch auffälligen Bestände. Deswegen kann mithilfe dieser Studie eine Prävalenzaussage zu PCV2 und den zugehörigen Genotypen in deutschen Schweinemastbeständen getroffen werden.

In Bezug auf den aktuellen Genotypen-Shift kann in vorliegender Studie wie auch im internationalen Vergleich die hohe Nachweisrate von PCV2d beobachtet werden. Eine deutliche Verminderung der Nachweisrate von PCV2b wird offenkundig.

.

## VII. SUMMARY

The present study examines the occurrence of PCV2 in pigs of 86 finishing Farm by using oral fluids. In addition to that, PCV2 were differentiated into the genotypes PCV2a, PCV2b and PCV2d. The oral fluid samples were collected in the period from March until December 2019. The examined pigs were 18 weeks old. Viral DNA was detected by qPCR and all positive samples were genotyped. This categorization has been performed by a new method of genotyping PCR. Some representative samples of PCV2-positive farms were selected for full-genome sequencing and phylogenetic analyses.

Overall, 37.2% (32/86) of the randomly selected farms had at least one sample positive for PCV2-DNA. At least 11.6% (10/86) of the farms were infected with PCV2a, 4.7% (4/86) with PCV2b and 18.6% with PCV2d. Two farms (2.3% of the farms) had combined infections, once PCV2a and PCV2b and once PCV2b and PCV2d.

Out of these PCV2-positive herds 31.3% (10/32) were positive for PCV2a, 3.1% (1/32) were positive for PCV2a and PCV2d. Only 12.5% (4/32) of the farms were positive for PCV2b and one also had a combined infection of PCV2b and PCV2d, translates into 3.1% (1/32). Most of the herds were positive for PCV2d: 50.0% (16/32) were tested positive for this genotype.

As possible farm-specific influencing factors on the occurrence of PCV2 in general or on the categorization of the genotypes of PCV2 different factors have been investigated. Only the vaccination of the according sows against parvovirus and erysipelas had a statistically significant influence on the detection rate of PCV2. Farms with this vaccination pattern had an increased occurrence of PCV2.

The investigation of factors for the occurrence of the different PCV2 genotypes resulted in nearly the same findings. Some factors such as the type of pig production system (e.g. farrow to finish and finisher farms) had statistically significant influence on the genotype detection of PCV2b. But most of the analysed factors only showed a tendency rather than significant influence. PCV2b is more often detected in farrow to finish

farms and PCV2d is prevalent in finisher farms. No clinical correlation was shown for the occurrence of PCV2 and the distribution of PCV2-genotypes.

The absence of clear influential factors for the detection rate of PCV2 and the distribution of genotypes shows the ubiquitous character of PCV2.

In the present study the prevalence is not as high as in other international studies, because the inclusion of farm was not performed by clinical expressions. This completely unbiased selection of farms gives the possibility to determine the prevalence of PCV2 and corresponding genotypes in German fattening farms.

According this study, in Germany and as well on international level, the genotype-shift is ongoing, PCV2d has a very high detection rate whereas PCV2b is very rare.

## VIII. TABELLENVERZEICHNIS

*Tabelle 1: Nachweisraten von PCV2 und dessen Genotypen verschiedener nationaler und internationaler Autoren..... 12*

*Tabelle 2: Aufstellung der Anzahl der Mastbestände deutschlandweit mit prozentualer Verteilung an der Studienpopulation (n=86) innerhalb der Bundesländer .....30*

*Tabelle 3: Primer der PCR nach GAGNON et al. (2007) .....37*

*Tabelle 4: Anteile der Bestände mit Ferkelimpfungen gegen PRRSV, PCV2, M. hyo oder Kombinationen daraus an allen in dieser Kategorie auswertbaren Bestände der Studienpopulation (n=84).....46*

*Tabelle 5: Anteile der Bestände mit Sauenimpfungen gegen PRRSV, PCV2, M. hyo und Parvo/Rotlauf an allen in dieser Kategorie auswertbaren Bestände der Studienpopulation (n=56).....47*

*Tabelle 6: Bestandsmanagement und der Stallbelegung der Bestände der Studienpopulation .....48*

*Tabelle 7: Tiergesundheitsindices nach QS der Bestände (n=56).....52*

*Tabelle 8: Vorkommen der PCV2-Genotypen (%) in den jeweiligen Bundesländern sowie positive Bestände.....57*

*Tabelle 9: PCV2-DNA Nachweis in Beständen mit unterschiedlichen Bestandsimpfungen der Sauen .....62*

*Tabelle 10: Faktoren des Bestandmanagement und die Zukaufroutine  
betreffend in Assoziation mit dem Nachweis von PCV2 in den Beständen,  
Aufgliederung der Anteile positiv und negativ gewerteter Bestände ..... 63*

*Tabelle 11: Assoziation des PCV2-DNA Nachweises in Oral mit der  
Kategorien der Ferkelverluste ..... 64*

*Tabelle 12: Zusammenhang des PCV2 Nachweises mit den Kategorien  
der Kennzahl der Therapiehäufigkeit ..... 65*

*Tabelle 13: Zusammenhang zwischen der Betriebsform und des  
Nachweises der Genotypen von PCV2..... 66*

*Tabelle 14: Korrelation zwischen den ermittelten Ct-Werten der  
Einzeluntersuchungen mit dem Anteil der positiven Einzelproben der  
jeweiligen Bestände..... 70*

## IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Verteilung Betriebsauswahl innerhalb der Bundesländer; Anzahl der untersuchten Bestände pro Bundesland im Verhältnis zur möglichen Anzahl an Beständen (von den Erzeugergemeinschaften übermittelt) .....</i>	<i>32</i>
<i>Abbildung 2: Aufgliederung der Vorgehensweise der molekular-biologischen Untersuchungen .....</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 3: Darstellung der Ferkelverluste aufsteigend sortiert in den Beständen mit Kategorisierung (I, II, III, IV) (n=81) .....</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 4: Darstellung der Kennzahl der Therapiehäufigkeit der Bestände aufsteigend sortiert mit Kategorisierung (I, II, III) (n=70).....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 5: Anzahl der untersuchten/ PCV2-positiven Oral Fluids pro Bestand (n=86) .....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 6: Deutschlandweite Verteilung der Bestände mit PCV2-Nachweis und deren Genotyp .....</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 7: Anteil der im Screening positiven Einzelproben (n=344) an den zurückgesandten Proben (n=1275) aller Bestände mit positivem Ergebnis im ersten Screening, aufgeschlüsselt nach den jeweiligen Beständen .....</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 8: PCV2-DNA Nachweis der Bestände mit unterschiedlichen Bestandsimpfungen bei Ferkeln (n=84) .....</i>	<i>61</i>

<i>Abbildung 9: Aufstellung der Ct-Werte aller Einzelproben innerhalb der PCV2-positiven Bestände .....</i>	<i>69</i>
---	-----------

<i>Abbildung 10: Ct-Werte der positiven Oral Fluids der Bestände mit Nachweis von PCV2a.....</i>	<i>72</i>
--	-----------

<i>Abbildung 11: Ct-Werte der positiven Oral Fluids der Bestände mit Nachweis von PCV2b.....</i>	<i>72</i>
--	-----------

<i>Abbildung 12: Ct-Werte der positiven Oral Fluids der Bestände mit Nachweis von PCV2d.....</i>	<i>72</i>
--	-----------

## **X. LITERATURVERZEICHNIS**

Afghah Z, Webb B, Meng X-J, Ramamoorthy S. Ten years of PCV2 vaccines and vaccination: is eradication a possibility? *Veterinary Microbiology* 2017; 206: 21-28.

Allan G, Mc Neilly F, Meehan B, Kennedy S, Mackie D, Ellis J, Clark E, Espuna E, Saubi N, Riera P. Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Veterinary Microbiology* 1999; 66: 115-123.

Allan GM, McNeilly F, Kennedy S, Daft B, Ellis JA, Haines DM, Meehan BM, Adair BM. Isolation of Porcine Circovirus-like Viruses from Pigs with a Wasting Disease in the USA and Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1998; 10: 3-10.

Allan GM, Ellis JA. Porcine circoviruses: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2000; 12: 3-14.

Bao F, Mi S, Luo Q, Guo H, Tu C, Zhu G, Gong W. Retrospective study of porcine circovirus type 2 infection reveals a novel genotype PCV 2f. *Transboundary and Emerging Diseases* 2018; 65: 432-440.

Bisht SS, Panda AK. DNA Sequencing: Methods and Applications. In: *Advances in Biotechnology*: Springer 2014: 11-23.

Bolin SR, Stoffregen WC, Nayar GP, Hamel AL. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2001; 13: 185-194.



Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *Journal of Virological Methods* 2004; 122: 171-178.

Büttner K, Krieter J, Traulsen A, Traulsen I. Static network analysis of a pork supply chain in Northern Germany—Characterisation of the potential spread of infectious diseases via animal movements. *Preventive Veterinary Medicine* 2013; 110: 418-428.

Carman S, Cai HY, DeLay J, Youssef SA, McEwen BJ, Gagnon CA, Tremblay D, Hazlett M, Lusi P, Fairles J. The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease 2004–2006. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2008; 72: 259.

Chae C. An emerging porcine circovirus type 2b mutant (mPCV2b) originally known as PCV2d. *Veterinary Journal* 2015; 203: 6.

Cheung A, Lager K, Kohutyuk O, Vincent A, Henry S, Baker R, Rowland R, Dunham A. Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Archives of Virology* 2007; 152: 1035.

Chiou M-T, Lin C-N, Yang C-Y, Su G-S, Lin C-F, Chang T-C. Genotypic change and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 in Taiwanese pig herds. *Journal of Veterinary Medical Science* 2012: 12-44.

Corthier G, Galicher C, Gelfi J. Swine fever: influence of passive immunity on pig immune response following vaccination with a live virus vaccine (Thiverval strain). *Annals of Veterinary Research* 1976; 4: 361-372.

Craig J. Measuring social behavior: social dominance. *Journal of Animal Science* 1986; 62: 1120-1129.

Davies B, Wang X, Dvorak CM, Marthaler D, Murtaugh MP. Diagnostic phylogenetics reveals a new porcine circovirus 2 cluster. *Virus Research* 2016; 217: 32-37.

Day J, Kyriazakis I, Lawrence A. The effect of food deprivation on the expression of foraging and exploratory behaviour in the growing pig. *Applied Animal Behaviour Science* 1995; 42: 193-206.

de Boissésou C, Béven V, Bigarré L, Thiéry R, Rose N, Eveno E, Madec F, Jestin A. Molecular characterization of Porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. *Journal of General Virology* 2004; 85: 293-304.

Dieste-Pérez L, Van Nes A, Van Maanen K, Duinhof T, Tobias T. The prevalence of PCV2 viremia in newborn piglets on four endemically infected Dutch sow farms is very low. *Preventive Veterinary Medicine* 2018; 153: 42-46.

Dupont K, Nielsen E, Baekbo P, Larsen L. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Veterinary Microbiology* 2008; 128: 56-64.

Dvorak CM, Lilla MP, Baker SR, Murtaugh MP. Multiple routes of porcine circovirus type 2 transmission to piglets in the presence of maternal immunity. *Veterinary Microbiology* 2013; 166: 365-374.

Dvorak CM, Yang Y, Haley C, Sharma N, Murtaugh MP. National reduction in porcine circovirus type 2 prevalence following introduction of vaccination. *Veterinary Microbiology* 2016; 189: 86-90.

Eddicks M, Fux R, Szikora F, Eddicks L, Majzoub-Altweck M, Hermanns W, Sutter G, Palzer A, Banholzer E, Ritzmann M. Detection of a new cluster of porcine circovirus type 2b strains in domestic pigs in Germany. *Veterinary Microbiology* 2015; 176: 337-343.

Eddicks M, Koeppen M, Willi S, Fux R, Reese S, Sutter G, Stadler J, Ritzmann M. Low prevalence of porcine circovirus type 2 infections in farrowing sows and corresponding pre-suckling piglets in southern German pig farms. *Veterinary Microbiology* 2016; 187: 70-74.

Eddicks M, Szikora F, Walhöfer N, Sauter CL, Reese S, Banholzer E, Reiner G, Sutter G, Ritzmann M, Fux R. Occurrence of genotypes of porcine circovirus (PCV2) in pig farms using different vaccination strategies against PCV2. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere* 2017; 45: 90-97.

Eddicks M, Beuter B, Stuhldreier R, Nolte T, Reese S, Sutter G, Ritzmann M, Fux R. Cross-sectional study on viraemia and shedding of porcine circovirus type 2 in a subclinically infected multiplier sow herd. *Veterinary Record* 2018a: vetrec-2018-105069.

Eddicks M, Fux R, Reiner G, Willems H, Sidler X, Kuemmerlen D, Fiebig K, Ratzke K, Ritzmann M (2018b) Large scale examination of PCV2-genotype distribution in fattening pigs in Germany, The Netherlands and Switzerland. *Proc. Int. Pig Vet. Soc. Chongqing, China*. 426.

Ellis J, Hassard L, Clark E, Harding J, Allan G, Willson P, Strokappe J, Martin K, McNeilly F, Meehan B. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *The Canadian Veterinary Journal* 1998; 39: 44.

Fachinger V, Bischoff R, Jedidia SB, Saalmüller A, Elbers K. The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccine* 2008; 26: 1488-1499.

Feng H, Blanco G, Segalés J, Sibila M. Can Porcine circovirus type 2 (PCV2) infection be eradicated by mass vaccination? *Veterinary Microbiology* 2014; 172: 92-99.

Finlaison D, Collins A. Evaluation of oral fluid samples for herd health monitoring of pathogens and the immune response in pigs. 2A-108 1213. 2014.

Firth C, Charleston MA, Duffy S, Shapiro B, Holmes EC. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2. *Journal of Virology* 2009; 83: 12813-12821.

Fort M, Sibila M, Allepuz A, Mateu E, Roerink F, Segalés J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. *Vaccine* 2008; 26: 1063-1071.

Franzo G, Cortey M, de Castro AMMG, Piovezan U, Szabo MPJ, Drigo M, Segalés J, Richtzenhain LJ. Genetic characterisation of Porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from feral pigs in the Brazilian Pantanal: An opportunity to reconstruct the history of PCV2 evolution. *Veterinary Microbiology* 2015a; 178: 158-162.

Franzo G, Cortey M, Olvera A, Novosel D, De Castro AMMG, Biagini P, Segalés J, Drigo M. Revisiting the taxonomical classification of Porcine Circovirus type 2 (PCV2): still a real challenge. *Virology Journal* 2015b; 12: 131.

Franzo G, Cortey M, Segalés J, Hughes J, Drigo M. Phylodynamic analysis of porcine circovirus type 2 reveals global waves of emerging genotypes and the circulation of recombinant forms. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2016; 100: 269-280.

Franzo G, Segalés J. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. *PloS one* 2018; 13: e0208585.

Gagnon CA, Tremblay D, Tijssen P, Venne M-H, Houde A, Elahi SM. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *The Canadian Veterinary Journal* 2007; 48: 811.

Gagnon CA, Del Castillo JR, Music N, Fontaine G, Harel J, Tremblay D. Development and use of a multiplex real-time quantitative polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of Porcine circovirus-2 genotypes 2a and 2b in an epidemiological survey. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2008; 20: 545-558.

Gerber PF, Garrocho FM, Lana ÂM, Lobato ZI. Serum antibodies and shedding of infectious porcine circovirus 2 into colostrum and milk of vaccinated and unvaccinated naturally infected sows. *The Veterinary Journal* 2011; 188: 240-242.

Grau-Roma L, Crisci E, Sibila M, Lopez-Soria S, Nofrarias M, Cortey M, Fraile L, Olvera A, Segalés J. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Veterinary Microbiology* 2008; 128: 23-35.

Grau-Roma L, Hjulsager CK, Sibila M, Kristensen CS, López-Soria S, Enøe C, Casal J, Bøtner A, Nofrarias M, Bille-Hansen V. Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Veterinary Microbiology* 2009; 135: 272-282.

Guo L, Fu Y, Wang Y, Lu Y, Wei Y, Tang Q, Fan P, Liu J, Zhang L, Zhang F. A porcine circovirus type 2 (PCV2) mutant with 234 amino acids in capsid protein showed more virulence in vivo, compared with classical PCV2a/b strain. *PLoS One* 2012; 7: e41463.

Guo LJ, Lu YH, Wei YW, Huang LP, Liu CM. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virology Journal* 2010; 7: 273.

Haake M, Palzer A, Rist B, Weissenbacher-Lang C, Fachinger V, Eggen A, Ritzmann M, Eddicks M. Influence of age on the effectiveness of PCV2 vaccination in piglets with high levels of maternally derived antibodies. *Veterinary Microbiology* 2014; 168: 272-280.

Hamel AL, Lin LL, Nayar GP. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Journal of Virology* 1998; 72: 5262-5267.

Hamel AL, Lin LL, Sachvie C, Grudeski E, Nayar G. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2000; 64: 44.

Hansen MS, Pors SE, Jensen H, Bille-Hansen V, Bisgaard M, Flachs EM, Nielsen OL. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *Journal of Comparative Pathology* 2010; 143: 120-131.

Harding J (2007) Porcine circovirus diseases (PCVD): the brutal facts. American Association of Swine Veterinarians-Proceedings Conference, Orlando, FL. 349-352.

Harding JC, Clark EG. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Swine Health and Production* 1997; 5: 201-203.

Harmon KM, Gauger PC, Zhang J, Piñeyro PE, Dunn DD, Chriswell AJ. Whole-genome sequences of novel porcine circovirus type 2 viruses detected in swine from Mexico and the United States. *Genome Announc.* 2015; 3: e01315-01315.

Harms PA, Halbur PG, Sorden SD. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *Journal of Swine Health and Production* 2002; 10: 27-30.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 1996; 6: 986-994.

Hernandez-Garcia J, Robben N, Magnée D, Eley T, Dennis I, Kayes SM, Thomson JR, Tucker AW. The use of oral fluids to monitor key pathogens in porcine respiratory disease complex. *Porcine Health Management* 2017; 3: 7.

Jacobsen B, Krueger L, Seeliger F, Bruegmann M, Segalés J, Baumgaertner W. Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Veterinary Microbiology* 2009; 138: 27-33.

Kim J, Chung H-K, Chae C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *The Veterinary Journal* 2003; 166: 251-256.

Kim J, Chae C. A comparison of virus isolation, polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in experimentally and naturally coinfecting pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2004; 16: 45-50.

Kim S-C, Nazki S, Kwon S, Juhng J-H, Mun K-H, Jeon D-Y, Jeong C-G, Khatun A, Kang S-J, Kim W-I. The prevalence and genetic characteristics of porcine circovirus type 2 and 3 in Korea. *BMC Veterinary Research* 2018; 14: 294.

Kim W-I. Application of oral fluid sample to monitor porcine circovirus-2 infection in pig farms. *Journal of Veterinary Clinics* 2010; 27: 704-712.

Kittawornrat A, Zimmerman JJ. Toward a better understanding of pig behavior and pig welfare. *Animal Health Research Reviews* 2011; 12: 25-32.

Kixmüller M, Ritzmann M, Eddicks M, Saalmüller A, Elbers K, Fachinger V. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine* 2008; 26: 3443-3451.

Kwon T, Lee D-U, Yoo SJ, Sang HJ, Shin JY, Lyoo YS. Genotypic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) and genotype shift to PCV2d in Korean pig population. *Virus Research* 2017; 228: 24-29.

Larochelle R, Magar R, D'Allaire S. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. *Virus Research* 2002; 90: 101-112.

Liu J, Chen I, Du Q, Chua H, Kwang J. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *Journal of Virology* 2006; 80: 5065-5073.

López-Lorenzo G, Díaz-Cao JM, Prieto A, López-Novo C, López CM, Díaz P, Rodríguez-Vega V, Díez-Baños P, Fernández G. Environmental distribution of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) in swine herds with natural infection. *Scientific Reports* 2019; 9: 1-8.



López-Soria S, Segalés J, Rose N, Vinas M, Blanchard P, Madec F, Jestin A, Casal J, Domingo M. An exploratory study on risk factors for postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Preventive Veterinary Medicine* 2005; 69: 97-107.

Lukert P, De Boer G, Dale J, Keese PK, McNulty M, Randles JW, Tischer I. Family *Circoviridae*. In: *Virus Taxonomy*: Springer-Verlag 1995: 166-168.

Madec F, Eveno É, Morvan P, Hamon L, Morvan H, Albina E, Truong C, Hutet É, Cariolet R, Arnould C. La Maladie de l'Amaigrissement du Porcelet (MAP) en France. *Journées de la Rech* 1999; 31: 347-354.

Mankertz A, Mankertz J, Wolf K, Buhk H-J. Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus. *Journal of General Virology* 1998; 79: 381-384.

Mankertz A, Domingo M, Folch JM, LeCann P, Jestin A, Segalés J, Chmielewicz B, Plana-Durán J, Soike D. Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Research* 2000; 66: 65-77.

Meehan BM, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst VA, Ellis JA, Hassard LE, Clark EG, Haines DM, Allan GM. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of General Virology* 1998; 79: 2171-2179.

Mukherjee P, Karam A, Barkalita L, Borah P, Chakraborty AK, Das S, Puro K, Sanjukta R, Ghatak S, Shakuntala I. Porcine circovirus 2 in the North Eastern region of India: Disease prevalence and genetic variation among the isolates from areas of intensive pig rearing. *Acta Tropica* 2018; 182: 166-172.

Nawagitgul P, Morozov I, Bolin SR, Harms PA, Sorden SD, Paul PS. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *Journal of General Virology* 2000; 81: 2281-2287.

Nickoll I. Porzines Circovirus Typ 2 (PCV2)-Infektionen in oberbayerischen Schweinemastbeständen mit routinemäßiger Impfung gegen PCV2 und deren Bedeutung für das Auftreten von Lungenveränderungen. 2018. Diss. med. vet. Ludwig-Maximilians-Universität München

Nielsen GB, Nielsen JP, Haugegaard J, Leth SC, Larsen LE, Kristensen CS, Pedersen KS, Stege H, Hjulsager CK, Houe H. Comparison of serum pools and oral fluid samples for detection of porcine circovirus type 2 by quantitative real-time PCR in finisher pigs. *Porcine Health Management* 2018; 4: 2.

Oliver-Ferrando S, Segalés J, López-Soria S, Callén A, Merdy O, Joisel F, Sibila M. Evaluation of natural porcine circovirus type 2 (PCV2) subclinical infection and seroconversion dynamics in piglets vaccinated at different ages. *Veterinary Research* 2016; 47: 121.

Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M, Segalés J, Domingo M. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *Journal of Virological Methods* 2004; 117: 75-80.

Olvera A, Cortey M, Segales J. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology* 2007; 357: 175-185.

Opriessnig T, Meng X-J, Halbur PG. Porcine circovirus type 2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2007; 19: 591-615.

Opriessnig T, Prickett JR, Madson DM, Shen H-G, Juhan NM, Pogranichniy RM, Meng X-J, Halbur PG. Porcine circovirus type 2 (PCV2)-infection and re-inoculation with homologous or heterologous strains: virological, serological, pathological and clinical effects in growing pigs. *Veterinary Research* 2010; 41: 31.

Opriessnig T, Xiao C-T, Gerber PF, Halbur PG. Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the US concurrently infected with PPV2. *Veterinary Microbiology* 2013; 163: 177-183.

Opriessnig T, Langohr I. Current state of knowledge on porcine circovirus type 2-associated lesions. *Veterinary Pathology* 2013; 50: 23-38.

Opriessnig T, Xiao C-T, Gerber PF, Halbur PG, Matzinger SR, Meng X-J. Mutant USA strain of porcine circovirus type 2 (mPCV2) exhibits similar virulence to the classical PCV2a and PCV2b strains in caesarean-derived, colostrum-deprived pigs. *The Journal of General Virology* 2014a; 95: 2495.

Opriessnig T, Xiao C-T, Gerber PF, Halbur PG. Identification of recently described porcine parvoviruses in archived North American samples from 1996 and association with porcine circovirus associated disease. *Veterinary Microbiology* 2014b; 173: 9-16.

Opriessnig T, Karuppannan AK, Halbur PG, Calvert JG, Nitzel GP, Matzinger SR, Meng X-J. Porcine circovirus type 2a or 2b based experimental vaccines provide protection against PCV2d/porcine parvovirus 2 co-challenge. *Vaccine* 2020; 38: 1975-1981.

Palzer A, Ritzmann M, Wolf G, Heinritzi K. Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia. *Veterinary Record* 2008; 162: 267-271.

Park J-S, Kim J, Ha Y, Jung K, Choi C, Lim J-K, Kim S-H, Chae C. Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. *Journal of Comparative Pathology* 2005; 132: 139-144.

Patterson A, Madson D, Halbur P, Opriessnig T. Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after natural exposure. *Veterinary Microbiology* 2011a; 149: 225-229.

Patterson A, Ramamoorthy S, Madson D, Meng X, Halbur P, Opriessnig T. Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after experimental infection. *Veterinary Microbiology* 2011b; 149: 91-98.

Phan TG, Giannitti F, Rossow S, Marthaler D, Knutson TP, Li L, Deng X, Resende T, Vannucci F, Delwart E. Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *Virology Journal* 2016; 13: 184.

Prickett J, Johnson J, Murtaugh M, Puvanendiran S, Wang C, Zimmerman J, Opriessnig T. Prolonged Detection of PCV2 and Anti-PCV2 Antibody in Oral Fluids Following Experimental Inoculation. *Transboundary and Emerging Diseases* 2011; 58: 121-127.

Prickett JR, Kim W, Simer R, Yoon K-J, Zimmerman J. Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *Journal of Swine Health and Production* 2008; 16: 86-91.

Prickett JR, Zimmerman JJ. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *Animal Health Research Reviews* 2010; 11: 207-216.

Puvanendiran S, Stone S, Yu W, Johnson CR, Abrahante J, Jimenez LG, Griggs T, Haley C, Wagner B, Murtaugh MP. Absence of porcine circovirus type 1 (PCV1) and high prevalence of PCV 2 exposure and infection in swine finisher herds. *Virus Research* 2011; 157: 92-98.

QS Qualität und Sicherheit GmbH. Liste QS-zugelassener Bündler / list of QS-approved coordinators. 2016: [https://www.q-s.de/services/files/downloadcenter/6\\_weitere\\_unterlagen/buendler/B%C3%BCndlerliste\\_Tier\\_2020\\_01\\_13.pdf](https://www.q-s.de/services/files/downloadcenter/6_weitere_unterlagen/buendler/B%C3%BCndlerliste_Tier_2020_01_13.pdf). 17.07.2018.

QS Qualität und Sicherheit GmbH. QS berechnet erstmals Tiergesundheitsindex. 2018: <https://www.q-s.de/pressemeldungen/qs-berechnet-erstmalstiergesundheitsindex.html>. 07.11.2019.

Ramirez A, Wang C, Prickett JR, Pogranichniy R, Yoon K-J, Main R, Johnson JK, Rademacher C, Hoogland M, Hoffmann P. Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Preventive Veterinary Medicine* 2012; 104: 292-300.

Ramos N, Porley D, Mirazo S, Castro G, Cabrera K, Lozano A, Arbiza J. Molecular study of porcine circovirus type 2 in wild boars and domestic pigs in uruguay from 2010 to 2014: Predominance of recombinant circulating strains. *Gene* 2017; 637: 230-238.

Ratzke K. Vorkommen von PCV2-Genotypen bei Schweinen im Alter von 16 bis 24 Wochen aus Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz. 2019. Diss. med. vet. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Ritzmann M, Vorbuchner K, Majzoub M, Hermanns W, Heinritzi K, Geißler K, Truyen U. Untersuchungen zur Verbreitung des porzinen Circovirus Typ 2 in Bayern. *Tierärztliche Praxis* 2002; 30: 386-391.

Rose N, Larour G, Le Diguerher G, Eveno E, Jolly J, Blanchard P, Oger A, Le Dimna M, Jestin A, Madec F. Risk factors for porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 149 French farrow-to-finish herds. *Preventive Veterinary Medicine* 2003; 61: 209-225.

Rose N, Opriessnig T, Grasland B, Jestin A. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research* 2012; 164: 78-89.

Rosell C, Segalés J, Plana-Duran J, Balasch M, Rodríguez-Arrioja G, Kennedy S, Allan G, McNeilly F, Latimer K, Domingo M. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *Journal of Comparative Pathology* 1999; 120: 59-78.

Seddon Y, Guy J, Edwards S. Optimising oral fluid collection from groups of pigs: effect of housing system and provision of ropes. *The Veterinary Journal* 2012; 193: 180-184.

Segalés J, Allan GM, Domingo M. Porcine circovirus diseases. *Animal Health Research Reviews* 2005; 6: 119-142.

Segalés J, Olvera A, Grau-Roma L, Charreyre C, Nauwynck H, Larsen L, Dupont K, McCullough K, Ellis J, Krakowka S. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Veterinary Record* 2008; 162: 867-868.

Segalés J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Research* 2012; 164: 10-19.

Segalés J, Allan GM, Domingo M. Porcine Circoviruses. In: *Diseases of Swine* John Wiley & Sons Inc: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW 2019: 405-417.

Shen H-G, Halbur PG, Opriessnig T. Prevalence and phylogenetic analysis of the current porcine circovirus 2 genotypes after implementation of widespread vaccination programmes in the USA. *Journal of General Virology* 2012; 93: 1345-1355.

Shen H, Wang C, Madson DM, Opriessnig T. High prevalence of porcine circovirus viremia in newborn piglets in five clinically normal swine breeding herds in North America. *Preventive Veterinary Medicine* 2010; 97: 228-236.

Shibata I, Okuda Y, Yazawa S, Ono M, Sasaki T, Itagaki M, Nakajima N, Okabe Y, Hidejima I. PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. *Journal of Veterinary Medical Science* 2003; 65: 405-408.

Sibila M, Calsamiglia M, Segalés J, Blanchard P, Badiella L, Le Dimna M, Jestin A, Domingo M. Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *American Journal of Veterinary Research* 2004; 65: 88-92.

Statistisches Bundesamt. Viehbestand und tierische Erzeugung - Fachserie 3 Reihe 4 - 2017. 2017.

Szikora F. Studie zum Vorkommen der Genotypen PCV2a und PCV2b des Porcinen Circovirus Typ 2 in schweinehaltenden Betrieben mit unterschiedlichen PCV2-Impfregimen. 2015. Diss. med. vet. Ludwigs-Maximilians-Universität München.

Tischer I, Rasch R, Tochtermann G. Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie 1974; 226: 153-167.

Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, Koch M. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. Nature 1982; 295: 64.

Tischer I, Mielsch W, Wolff D, Vagt M, Griem W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. Archives of Virology 1986; 91: 271-276.

Urbaniak GC, & Plous, S. . Research Randomizer (Version 4.0) [Computer software]. 2013: <http://www.randomizer.org/>. 01.02.2019.

Van Cuong N, Carrique-Mas J, Thu HTV, Hien ND, Hoa NT, Nguyet LA, Anh PH, Bryant JE. Serological and virological surveillance for porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, and influenza A viruses among smallholder swine farms of the Mekong Delta, Vietnam. Journal of Swine Health and Production 2014; 22: 224-231.

Walhöfer NF. Auswirkungen betriebspezifischer Faktoren auf den Verlauf von Infektionen mit dem Porcinen Circovirus Typ 2. 2015. Diss. med. vet. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Walker IW, Konoby CA, Jewhurst VA, McNair I, McNeilly F, Meehan BM, Cottrell TS, Ellis JA, Allan GM. Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2000; 12: 400-405.



Wang Y, Noll L, Lu N, Porter E, Stoy C, Zheng W, Liu X, Peddireddi L, Niederwerder M, Bai J. Genetic diversity and prevalence of porcine circovirus type 3 (PCV3) and type 2 (PCV2) in the Midwest of the USA during 2016–2018. *Transboundary and Emerging Diseases* 2020; 00: 1-11.

Wellenberg G, Bouwkamp F, Wolf P, Swart W, Mombarg M, De Gee A. A study on the severity and relevance of porcine circovirus type 2 infections in Dutch fattening pigs with respiratory diseases. *Veterinary microbiology* 2010; 142: 217-224.

Wiederkehr DD, Sydler T, Buergi E, Haessig M, Zimmermann D, Pospischil A, Brugnera E, Sidler X. A new emerging genotype subgroup within PCV-2b dominates the PMWS epizooty in Switzerland. *Veterinary Microbiology* 2009; 136: 27-35.

Woodbine K, Medley G, Slevin J, Kilbride A, Novell E, Turner M, Keeling M, Green L. Spatiotemporal patterns and risks of herd breakdowns in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Veterinary Record* 2007; 160: 751-762.

Xia D, Huang L, Xie Y, Zhang X, Wei Y, Liu D, Zhu H, Bian H, Feng L, Liu C. The prevalence and genetic diversity of porcine circovirus types 2 and 3 in Northeast China from 2015 to 2018. *Archives of Virology* 2019; 164: 2435-2449.

Xiao C-T, Halbur PG, Opriessnig T. Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 2b variant present in cases of vaccine failures in the United States. *Journal of Virology* 2012; 86: 12469.

Xiao C-T, Halbur PG, Opriessnig T. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. *Journal of General Virology* 2015; 96: 1830-1841.

Xiao C-T, Harmon KM, Halbur PG, Opriessnig T. PCV2d-2 is the predominant type of PCV2 DNA in pig samples collected in the US during 2014–2016. *Veterinary Microbiology* 2016; 197: 72-77.

Xu P-L, Zhao Y, Zheng H-H, Tian R-B, Han H-Y, Chen H-Y, Zheng L-L. Analysis of genetic variation of porcine circovirus type 2 within pig populations in central China. *Archives of Virology* 2019; 164: 1445-1451.

Zhang HH, Hu WQ, Li JY, Liu TN, Zhou JY, Opriessnig T, Xiao CT. Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as Porcine circovirus 4, Hunan province, China. *Transboundary and Emerging Diseases* 2019; 00: 1-5.

Zhao K, Han F, Zou Y, Zhu L, Li C, Xu Y, Zhang C, Tan F, Wang J, Tao S. Rapid detection of porcine circovirus type 2 using a TaqMan-based real-time PCR. *Virology Journal* 2010; 7: 374.

Zhou W, Ullman K, Chowdry V, Reining M, Benyeda Z, Baule C, Juremalm M, Wallgren P, Schwarz L, Zhou E. Molecular investigations on the prevalence and viral load of enteric viruses in pigs from five European countries. *Veterinary Microbiology* 2016; 182: 75-81.

## XI. ANHANG

### 1. Beprobungsplan

#### Beprobungsplan

1 Kaustrick pro maximal 20 Schweine  
In der 18. Lebenswoche der Tiere

#### Für ihren Bestand:

Bei 20 Tieren pro Bucht -> 1 Strick pro Bucht  
individuelle pro Bestand



Kaustricke  
Kabelbinder  
Auspresstüten mit Probengefäßen  
Einmalhandschuhe  
Schere und Verpackungs-tüten/-paket



Vielen Dank für Ihre Unterstützung.

Sarah und Marina



Befestigung der Kabelbinder  
zwischen den Knoten



Befestigung der Kaustricke  
möglichst freihängend,  
auf Schulterhöhe der Tiere,  
für möglichst alle erreichbar  
gut befestigt



Stricke mind. 20, max. 25 Minuten in der Bucht lassen



Nassen Teil des Kastricks in die Auspresstüte geben und im trockenen Abschnitt abschneiden.



Auswringen des durchnässten Strickstück, sodass die Flüssigkeit in das Probengefäß fließt. Den Übergang mit den Fingern abdichten um Verluste zu vermeiden. Gewünschte Füllmenge: 5ml



Probengefäß fest verschließen.



Probengefäße in Zip-Tüte verpacken mit Kühl-Akku in die zweite Tüte packen.

Zusammen mit dem ausgefüllten Fragebogen in der Süsse Post Box® versenden.



Bitte Anfang der Woche zur Post geben.  
In der Zeit im Kühlschrank lagern.

## 2. Fragebogen

### Betriebsdaten

Anschrift: \_\_\_\_\_ Tierarzt: \_\_\_\_\_

Postleitzahl: \_\_\_\_\_  
(obligatorisch)

### Betriebsart

☐ geschlossen ☐ ausschließlich Mast

### Impfprogramm

Ferkel	Zeitpunkt	Stamm/Impfstoff
<input type="checkbox"/> PRRS	_____	_____
<input type="checkbox"/> PCV2	_____	_____
<input type="checkbox"/> M. hyo	_____	_____ oneshot / two shot
<input type="checkbox"/> Sonstige	_____	

Muttersauen	Zeitpunkt	Stamm/Impfstoff
<input type="checkbox"/> PRRS	_____	_____
<input type="checkbox"/> PCV2	_____	_____
<input type="checkbox"/> M. hyo	_____	_____ oneshot/twoshot
<input type="checkbox"/> Parvo/Rotlauf	_____	_____
<input type="checkbox"/> Sonstige	_____	

### Betriebsmanagement

Belegung: ☐ kontinuierlich  
☐ Rein-Raus -> ☐ Stallweise ☐ Abteilweise  
☐ Buchtenweise

**Kontaktmöglichkeiten der Tiere**

Haben Sie eine Krankenbucht? ☐ ja ☐ nein

Stehen die Tiere darin in direktem Kontakt zum Gesamtbestand?

☐ ja ☐ nein

Werden Tiere aus der Krankenbucht wieder in ihre Gruppe integriert?

☐ ja ☐ nein

Bleiben schlechter wachsende Tiere in der Gruppe? \_\_\_\_\_

Wenn nein: Werden diese in jüngere Gruppen

eingegliedert? \_\_\_\_\_

Wie lange steht der Stall leer? \_\_\_\_\_

☐ Abteilweise ☐

Buchtenweise

**Ferkelherkunft**

☐ eine Herkunft ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 oder mehr Herkünfte

aus ☐ Deutschland ☐ Niederlande ☐ Dänemark

Landkreis: \_\_\_\_\_ ☐ Belgien

**Reinigung und Desinfektion**

☐ Grob mit Wasser \_\_\_\_\_

☐ Desinfektionsmittel \_\_\_\_\_

Einwirkdauer \_\_\_\_\_

☐ Anwender selbst oder wer anders/extern?

\_\_\_\_\_

☐ Schadnager: Bekämpfung? \_\_\_\_\_

☐ Intern ☐

Extern

Strategie der Entseuchung: \_\_\_\_\_

☐ Belüftung: Zwangsbelüftung/ Überdruck-Unterdruck / Filter

\_\_\_\_\_

Ferkelverluste Mast: \_\_\_\_\_

Auffälligkeiten am Schlachthof: \_\_\_\_\_

Tiergesundheitsindex nach QS:

Atemwegs- gesundheit	sonstige Organgesundheit	Gliedmaßen- gesundheit	Unversehrtheit

Haben Sie Probleme mit.... (1=überhaupt nicht; 5=großes Problem)

Kümmern	1	2	3	4	5
Durchfall	1	2	3	4	5
Husten	1	2	3	4	5
Lahmheit	1	2	3	4	5

Kennzahl zur Therapiehäufigkeit im letzten Quartal: \_\_\_\_\_

### 3. Betriebscharakteristika

Legende: Spalte 1 (v.l.): Bundesland  
 Spalte 2 (v.l.): Bestandsnummer  
 Spalte 3 (v.l.): Postleitzahl  
 Spalte 4 (v.l.): Betriebsart (M=reiner Mastbestand,  
 G=geschlossenes System)  
 Spalte 5 (v.l.): Anzahl der Tiere pro Altersgruppe  
 Spalte 6 (v.l.): Rhythmus des Zukaufs bzw. der Abferkelung  
 in Wochen  
 Spalte 7 (v.l.): Ferkelimpfungen  
 Spalte 8 (v.l.): Sauenimpfungen (P/R=Parvo/Rotlauf,  
 IAV=Influenza, Clos= Clostridien,  
 Gl=Glässerella parasuis)

BW	1	89547	M	1000		PRRSV, PCV2, M. hyo, Coli	PRRSV, PCV2, P/R
BW	2	74925	G	300-360	3	PCV2, M. hyo	PRRSV, P/R
BW	3	74595	G	200	2	PRRSV, PCV2, M. hyo	PRRSV, PCV2, M. hyo, P/R, IAV, Coli, RA
BW	4	74582	M	750	12		
BW	5	74582	M	330-360	2	PRRSV, PCV2, M. hyo, APP	PRRSV, P/R, IAV, APP
BW	6	74538	M	200	2	PRRSV, PCV2, M. hyo	PRRSV, P/R
BW	7	74639	M	240-360	2-3	PRRSV, PCV2, M. hyo	PRRSV, P/R, Coli
BW	8	74749	M	420	3	PCV2, M. hyo, Coli	
BY	9	84098	M	200		PRRSV, PCV2, M. hyo	PRRSV
BY	10	92363	M	240		PCV2, M. hyo, P/R, I	PCV2, P/R, IAV
BY	11	85646	M	200	2-3	PRRSV, M. hyo	
BY	12	94152	G	400	7	PRRSV, PCV2, M. hyo	PRRSV, P/R, IAV, Gl, Coli
BY	13	86732	M	300	2	PCV2, M. hyo, Gl	PRRSV, P/R
BY	14	84405	M	200	2	PCV2, M. hyo	PRRSV, P/R, IAV
BY	15	94474	M	200		PRRSV, PCV2, M. hyo	PRRSV, P/R
BY	16	63785	G	200	1	PCV2	PRRSV, PCV2, M. hyo, P/R
BY	17	84405	M			PRRSV, PCV2, M. hyo	



BY	18	84088	M	600	4	PRRSV, PCV2, M. hyo	
BY	19	86685	M	250	4	PRRSV, PCV2, M. hyo	
BY	20	84140	M	200		PCV2, M. hyo	PCV2, M. hyo, IAV
BY	21	86561	M	250	5	PRRSV	
BY	22	91628	M	202	3	PRRSV, PCV2, M. hyo, PIA	
BY	23	97616	G	200	3	PCV2, M. hyo, PIA	P/R, IAV
BY	24	91541	M	420-450	6	PRRSV, PCV2, M. hyo	
BY	25	97258	G	200		PCV2, M. hyo, Coli	PRRSV, PCV2, P/R, IAV
BY	26	86492	M			PRRSV, PCV2, M. hyo	
BB	27	06925	M	240		PRRSV, PCV2, M. hyo	
HE	28	63546	M			PRRSV, PCV2, M. hyo	
HE	29	34393	M	300-500	3-4	PRRSV, PCV2, M. hyo, APP	
HE	30	34305	M	510	4	PCV2, M. hyo, PIA	PRRSV, R/P, IAV, Coli, Clos, S, Gl
MV	31	18519	M				
NS	32	26892	M			PRRSV	
NS	33	49762	M			PCV2	PRRSV, PCV2, M. hyo, P/R, IAV
NS	34	49733	M			PCV2, M. hyo	PRRSV, PCV2, M. hyo, P/R, Coli
NS	35	26871	G			PRRSV, PCV2, M. hyo	PRRSV, PCV2, M. hyo, P/R, IAV, Clos
NS	36	49324	M			PCV2, M. hyo	
NS	37	31622	G			PRRSV, PCV2, M. hyo	PRRSV, PCV2, R/P, IAV, APP, Coli, Clos, Gl, RA
NS	38	49777	M			PRRSV, PCV2	PRRS, PCV2, P/R
NS	39	26676	M				
NS	40	49086	G			PCV2, M. hyo	PRRSV, PCV2, M. hyo, P/R, IAV
NS	41	49152	G			PRRSV, PCV2, M. hyo	PRRSV, P/R

NS	42	49152	M		PRRSV, PCV2, M. hyo	PRRSV
NS	43	49681	M		PCV2, M. hyo	
NS	44	49163	G		PRRSV, PCV2, M. hyo, Coli	PRRSV, P/R, Coli, Clos
NS	45	49163	M		PCV2, M. hyo	P/R
NS	46	49326	M		PRRSV, PCV2, M. hyo, Coli	PRRSV, PCV2, P/R, Coli,
NS	47	49326	M		PCV2, M. hyo	PRRSV, PCV2, M. hyo, P/R,
NS	48	49324	M		PCV2, M. hyo	PRRSV
NS	49	49134	M		PRRSV, PCV2, M. hyo, Strept	P/R, Coli
NS	50	49249	M		PCV2, M. hyo	P/R
NS	51	49661	M		PCV2, M. hyo	
NS	52	49219	G		PRRSV, PCV2, M. hyo	PRRSV, PCV2, M. hyo, P/R
NS	53	49752	G		PRRSV, PCV2, Coli	PRRSV, P/R, IAV
NRW	54	47665	G	3	PRRSV, PCV2, M. hyo, PIA	PCV2, M. hyo, P/R, IAV
NRW	55	47929	M		PCV2	PRRSV, PCV2
NRW	56	47929	M		PCV2, M. hyo	
NRW	57	47652	M		PCV2, M .hyo	
NRW	58	47906	M		PRRSV, PCV2, M .hyo	PRRSV, P/R
NRW	59	59510	M 220	4	PCV2, M. hyo	
NRW	60	59581	M		PRRSV, PCV2, M. hyo	GI
NRW	61	59581	M		PRRSV, PCV2, M. hyo	GI
NRW	62	48324	M		PRRSV, PCV2, M. hyo	PRRSV, PCV2, P/R, IAV, Coli, Clos, GI
NRW	63	48324	G		PRRSV, PCV2, M. hyo, Coli	PRRSV, PCV2, M. hyo, P/R
NRW	64	59269	G 1200		PRRSV, PCV2, M. hyo, APP	PRRSV, PCV2, M. hyo, P/R, IAV, APP, Coli, GI
NRW	65	59227	M 1400			
NRW	66	59227	M 420	4	PRRSV, PCV2, M .hyo	PRRSV, PCV2, M. hyo, P/R
NRW	67	48324	M 450	4	PCV2, M. hyo	PRRSV, P/R, IAV, APP, Coli
NRW	68	48231	G		PRRSV, PCV2, M. hyo	PRRSV, PCV2, M. hyo, P/R, Clos

NRW	69	48324	M	110-280	2	PRRSV, PCV2, M. hyo	PRRSV, PCV2, P/R, IAV, Coli, Clos, GI
NRW	70	48324	M		3	PRRSV, PCV2	
NRW	71	59229	G			PRRSV, PCV2, M. hyo	PRRSV, P/R, IAV
NRW	72	59329	M			PRRSV, PCV2, M. hyo	
NRW	73	48324	M			PCV2, M. hyo	PRRSV, PCV2, M. hyo, P/R
NRW	74	48432	G	600		PCV2, M. hyp	PRRSV, P/R, IAV
NRW	75	48432	G			PCV2, M. hyo	PRRSV, P/R
NRW	76	47918	M			PCV2, M. hyo	
NRW	77	59581	M			PRRSV, PCV2, M. hyo	GI
NRW	78	48691	M			PRRSV, PCV2, M. hyo, APP	
NRW	79	59320	G			PRRSV, PCV2, M. hyo, APP, GI	PRRSV, P/R, IAV, APP, Coli, Clos, GI
RP	80	56357	G			PCV2, M. hyo, PIA	P/R, Coli, Clos
S	81	04878	M			PCV2	P/R
SA	82	06917	M	400	2	PRRSV, PCV2	
SH	83	24392	G	200-300		PCV2, M. hyo	PRRSV, M. hyo, P/R
SH	84	24790	M	600	2		
SH	85	23795	M	200		PCV2, APP	
TH	86	07580	G	280	1	PRRSV, PCV2, M. hyo	PRRSV, P/R, IAV

## **XII. DANKSAGUNG**

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Mathias Ritzmann für das Überlassen dieses spannenden Themas und die Unterstützung in allen Belangen rund um diese Arbeit. Vielen Dank für all die besonnenen Worte und Aufmunterungen.

Ein besonderer Dank gilt auch meinem Betreuer Dr. med. vet. habil. Matthias Eddicks, der stets ein offenes Ohr für alle Fragestellungen hatte und immer neue Denkanstöße bereithielt. Vielen Dank für all die konstruktiven und inspirierenden Ideen.

Beim labordiagnostischen Arbeiten unterstützte mich Dr. med. vet. Robert Fux ungemein, trotz der diagnostischen Alltagsaufgaben half er sowohl bei der Ausführung wie auch bei der Auswertung der molekulargenetischen Untersuchungen, was großen Dank verdient.

Zusätzlich möchte ich mich beim gesamten Team der Schweineklinik bedanken, bei allen Kollegen, die mich stets unterstützten. Danke für jeden Rat, jede Hilfestellung und auch besonders das angenehme Arbeitsklima miteinander. Danke Sarah, für die tolle Zusammenarbeit im Rahmen der Kastrationsstudie und deine Unterstützung bei der Durchführung der Probennahme.

Nicht zu vergessen sind natürlich auch die beteiligten Erzeugergemeinschaften, Tierärztinnen und Tierärzte und vor allem die Betriebsleiter der teilnehmenden Bestände. Vielen Dank für das Vertrauen in unsere Arbeit, denn nur so konnte die Studie realisiert werden.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich stets unterstützt hat, schon während des Studiums und auch über diesen Zeitraum hinweg. Ohne all eure Unterstützung wäre das alles nicht möglich gewesen. Danke!

Danke Tobi, dass du mich immer aufgebaut und aufgefangen hast